

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Anatomía Patológica



TESIS DOCTORAL

**Modulación farmacológica con lidocaína intravenosa de la
respuesta inflamatoria y apoptótica inducida por isquemia-
reperfusión en un modelo experimental porcino de
autotrasplante pulmonar**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Andrea Romera Rabasa

Directores

**María Cebollero Presmanes
Ignacio Garutti Martínez
Carlos Simón Adiego**

Madrid 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica



**MODULACIÓN FARMACOLÓGICA CON LIDOCAÍNA
INTRAVENOSA DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y
APOPTÓTICA INDUCIDA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN
UN MODELO EXPERIMENTAL PORCINO DE
AUTOTRASPLANTE PULMONAR**

ANDREA ROMERA RABASA

MADRID, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica



**MODULACIÓN FARMACOLÓGICA CON LIDOCAÍNA
INTRAVENOSA DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y
APOPTÓTICA INDUCIDA POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN
UN MODELO EXPERIMENTAL PORCINO DE
AUTOTRASPLANTE PULMONAR**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR
ANDREA ROMERA RABASA**

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES

Dra. María Cebollero Presmanes

Dr. Ignacio Garutti Martínez

Dr. Carlos Simón Adiego

Madrid, 2017

Fracasa de nuevo. Fracasa mejor.

Samuel Beckett

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Cebollero Presmanes, médico adjunto de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón, por su paciencia para iniciarme en otra disciplina, su disponibilidad durante tantos años y su serenidad en todo momento.

Al inclasificable Dr. Ignacio Garutti Martínez, médico adjunto de Anestesiología y Reanimación del Hospital Gregorio Marañón. Su presencia posee la valiosísima capacidad de dar miedo y seguridad al mismo tiempo. El motor de su máquina de ideas se ha hecho siempre oír durante el arduo discurrir de esta tesis.

Esta tesis existe gracias al Dr. Carlos Simón Adiego, médico adjunto de Cirugía Torácica del Hospital Gregorio Marañón, que hizo la luz cada vez que estuvo oscuro. Precisamente por sus enseñanzas sé que hay muchas cosas que no pueden escribirse en un texto como éste, así que este intento – frustrado por inabarcable desde su inicio – de agradecerle como se merece un trabajo que desborda con creces su papel de director no logra reflejar ni una mínima parte de lo que ha hecho por mí. No se me olvida mencionar la generosidad de su mujer, Jezabel, y de su hija Clara, por prescindir muchas veces de él para que pudiera dedicarse a mi proyecto.

Al profesor y doctor Francisco Javier Carricondo Orejana y a la profesora asociada Bárbara Romero Gómez, del Departamento de Neurobiología de la Audición, por su ayuda con la histología, su paciencia con el microscopio y su disponibilidad para abrirme el laboratorio a cualquier hora. A Encarnación Muñoz Ferrero, que cuidó cada tinción de forma minuciosa, las modificó cuántas veces se lo solicité y me trató con amabilidad absoluta, incluso cuando le hice trabajar bajo mucha presión. A los tres, por su música. Estudiar preparaciones escuchándola hacía que todo fuera mejor.

A la doctora Elena Vara Ameigeiras, por ofrecerme las instalaciones de la Universidad de Medicina, su equipo y su tiempo. También a todo el personal de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Gregorio Marañón, que han hecho posible con su esfuerzo desarrollar esta línea de trabajo.

A Marisa Herranz Aladro y a Julio García Bordás, por su ayuda en el laboratorio del hospital durante todos estos años.

Este proyecto no habría sido igual sin Sara y Uxio. No podría haber tenido un equipo más divertido, más inteligente y más ganador. Dice siempre Sara que intentar convertirnos en doctores ha sacado lo peor de nosotros... ¡y no discrepo! Sólo añado que también ha sacado lo mejor. Sin ellos no sabría usar dropbox, ni los gestores bibliográficos, ni las tablas de contenido, ni la paleta de estilo. Sin ellos habría tardado el doble en aclararme con los casos y las muestras y los números y todas esas cosas esenciales. Sin ellos me habría reído mucho menos y me habría enfadado mucho más. De ellos me guardo la forma tan sana que tienen de enfrentarse al delirio y al caos. Mi agradecimiento se queda pequeño.

A mis suegros, que se ofrecieron una y mil veces a hacer *todo, todo, todo lo que hiciera falta* para que yo fuera doctora. Por su ayuda con los gráficos y photoshop. Por cuidar de Matías para que yo tuviera ese tiempo que tanto necesitaba.

A mi hermano Miguel, físico fundamental e investigador sesudo, cuya experiencia me ha ayudado mucho más de lo que él cree. A lo largo de estos cinco años he pensado en su tesis muy a menudo, y en el impacto que tuvo en mí. La suya fue una de las primeras defensas a las que asistí. Verlo hablar y moverse de ese modo en aquella tarima me obligó a preguntar a sus amigos: *¿Pero quién es ese?* Y ellos contestaron: *Uno de los nuestros*. Gracias, Miguelo, por ser siempre uno de los míos.

Decía Cioran que todo aprendizaje es solitario. El mío no lo ha sido. Yo he estado siempre acompañada por mis padres y por Pepe. Ellos ha sido el *otro equipo*: han estado horas en el laboratorio de la universidad, en el hospital, en el despacho desde donde escribo. Han entregado papeles, recogido documentos, pagado tasas. Han mapeado el documento en busca de errores, lo han estudiado para dar su opinión, han escuchado. Son el tipo de personas que siempre hace suya la carga ajena. Esta tesis, como todo lo importante que he hecho en la vida, es un poco suya.

Mi último agradecimiento es para mi hijo Matías, de cuarenta días de vida, algunos de los cuales han transcurrido entre muestras de histología y laboratorios de universidad. En medio del exceso de hipótesis, fallos, dudas e incertidumbres que constituyen el tejido de una tesis y de la ciencia en general, estaba siempre él, mi gran acierto.

LISTA DE ABREVIATURAS EN ORDEN ALFABÉTICO

Ac: anticuerpo

Ac-I: anticuerpo primario

Ac-II: anticuerpo secundario

ADP: adenosina-difosfato

Ag: antígeno

AL: anestésico local

AMP: adenosina-monofosfato

ATP: adenosina-trifosfato

BAS: basal

DAB: diaminobencidina

DNA: ácido dexosirribonucleico

ET: error típico

FASL: ligando de la proteína Fas

FC: frecuencia cardiaca

GC: gasto cardiaco

IL-1: interleuquina 1

MAPK: proteína kinasa activada por mitógenos

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NO: óxido nítrico

PAM: presión arterial media

PaO₂: presión parcial arterial de oxígeno

PaCO₂: presión parcial arterial de dióxido de carbono

PRER: pre-reperfusion

POSR60: post - reperfusion 60 minutos

RLO: radicales libres de oxígeno

RNA: ácido ribonucleico

SIR: síndrome isquemia-reperfusión

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

VVS: variación de volumen sistólico

ÍNDICE

1. RESUMEN/SUMMARY	1
2. INTRODUCCIÓN	12
Síndrome isquemia-reperfusión	13
<i>Fase de isquemia</i>	13
<i>Fase de reperfusión</i>	14
Síndrome isquemia-reperfusión en pulmón	15
<i>Mediadores celulares de la inflamación</i>	17
<i>Mediadores moleculares de la inflamación</i>	21
<i>Apoptosis</i>	26
Estrategias de preservación pulmonar durante el trasplante	31
Lidocaína.....	34
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
Hipótesis	38
Objetivos	38
4. MATERIAL Y MÉTODOS	40
Materiales.....	41
<i>Material biológico</i>	41
<i>Aparatos y material fungible</i>	42
<i>Disposición de los componentes y calibración</i>	43
<i>Quirófano e instalaciones</i>	44
Métodos.....	45
<i>Protocolo anestésico</i>	45
<i>Protocolo quirúrgico</i>	46
<i>Diseño experimental</i>	49
5. RESULTADOS	62
Variables generales	63
Variables hemodinámicas	64
Variables gasométricas	65

Resultados histopatológicos.....	66
<i>Tinción hematoxilina-eosina</i>	66
<i>Tinción inmunohistoquímica</i>	76
6. DISCUSIÓN	96
Parámetros respiratorios y hemodinámicos	99
Efecto antiinflamatorio de la lidocaína	101
Efecto antiapoptótico de la lidocaína.....	109
7. CONCLUSIONES	116
8. BIBLIOGRAFÍA	118

1. RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome de isquemia reperfusión (SIR) se define como el proceso que sufre un órgano sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo y a la reperfusión posterior con sangre oxigenada. El SIR pulmonar es un fenómeno de gran relevancia clínica, pues afecta directamente a la morbilidad temprana del trasplante de este órgano. Es la primera causa de fallo primario del injerto, aumenta el riesgo de rechazo agudo y, a largo plazo, de rechazo crónico. Los dos fenómenos claves en su etiopatogenia son la respuesta inflamatoria y la apoptosis. Existen numerosas estrategias terapéuticas encaminadas a atenuar ambos y disminuir así sus graves consecuencias clínicas. La lidocaína, además de su utilización tradicional como anestésico local y antiarrítmico, podría poseer efectos moduladores del daño pulmonar.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Con este modelo experimental planteamos la hipótesis de que la activación de que los mediadores celulares y moleculares en el SIR pulmonar podría manifestarse en fases muy precoces de la reperfusión mediante cambios histológicos e inmunohistoquímicos, y que los posibles efectos beneficiosos de la administración intravenosa de lidocaína podrían ponerse de manifiesto en la modificación de estos cambios histopatológicos.

2.2 Objetivos

El objetivo del presente estudio es investigar un posible efecto protector de la lidocaína intravenosa frente a la respuesta inflamatoria y apoptótica del SIR pulmonar. Para ello se usa un modelo experimental de autotrasplante pulmonar en cerdo. El lóbulo pulmonar es sometido en este protocolo a un periodo prolongado de isquemia y a una reperfusión de 60 minutos. Se obtienen biopsias pulmonares tras la reperfusión para evaluar los cambios histológico e inmunohistoquímico y las posibles diferencias que puedan observarse al administrar lidocaína intravenosa durante el procedimiento quirúrgico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Un grupo de 6 cerdos de la raza Large-White fue sometidos a un autotrasplante pulmonar ortotópico mediante neumonectomía izquierda, lobectomía craneal *ex – situ*, reimplantación del lóbulo caudal y reperfusión del mismo durante 60 minutos (grupo CON). Otro grupo de 6 cerdos de la misma raza fue sometido al mismo procedimiento, y además se le administró un bolo de lidocaína 1,5 mg/kg/iv tras la inducción y, durante el resto del procedimiento, una solución de lidocaína intravenosa a 1,5 mg/kg/h (grupo LIDO). Durante la intervención se analizaron diferentes parámetros hemodinámicos y gasométricos y, tras los 60 minutos de reperfusión del lóbulo trasplantado, se realizaron biopsias pulmonares del mismo para estudios histológicos e inmunohistoquímicos. Además, 6 cerdos fueron sometidos a cirugía simulada (grupo SHAM). En este grupo no se realizó resección pulmonar ni se administró lidocaína intravenosa.

En las biopsias pulmonares se realizó un doble estudio histológico, a través de la tinción con hematoxilina-eosina y mediante técnicas de inmunohistoquímica. En el análisis con hematoxilina-eosina se valoró el grado de inflamación y el tipo de célula inflamatoria, el grado de edema tisular y el grado de congestión. Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron con anticuerpos para los antígenos CD68 - expresado principalmente en células del sistema monocito-macrófago-, proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) - involucrada en la respuesta inflamatoria -, Bcl-2 - proteína antiapoptótica - y caspasa 9 -esencial en la ejecución de la apoptosis.

4. RESULTADOS

En nuestro modelo experimental se observó que:

- No había diferencias significativas en los parámetros hemodinámicos y gasométricos de los tres grupos.
- En los cerdos sometidos a isquemia-reperfusión, ésta indujo en el tejido pulmonar un aumento del infiltrado inflamatorio a los 60 minutos de perfusión (CON vs SHAM, $p= 0,026$). En esta infiltración inflamatoria se objetivó como célula predominante la estirpe monocito – macrófago (CON vs SHAM, $p = 0,005$). En el grupo que recibió tratamiento con lidocaína intravenosa esta inflamación fue menor que en el grupo no tratado (LIDO vs CON, $p= 0,026$), así como el infiltrado por células del sistema monocito-macrófago (LIDO vs CON, $p= 0,027$).

- La isquemia-reperfusión pulmonar indujo en el tejido pulmonar un aumento de la congestión, que fue mayor en los pulmones no tratados con lidocaína respecto al grupo de cirugía simulada (CON vs SHAM, $p= 0,005$).
- La isquemia-reperfusión indujo en el tejido pulmonar un aumento de la expresión de células con tinción positiva para CD68 a los 60 minutos de la reperfusión (CON vs SHAM, $p=0,002$). En los pulmones del grupo tratado con lidocaína se observa una disminución de las células con tinción positiva para CD68 con respecto al grupo que no recibió tratamiento (LIDO vs CON, $p=0,003$).
- La isquemia-reperfusión indujo en el tejido pulmonar un aumento de la expresión de células con tinción positiva para MCP-1 a los 60 minutos de la reperfusión (CON vs SHAM, $p=0,008$). En los pulmones del grupo tratado con lidocaína intravenosa se observa una disminución de las células con tinción positiva para MCP-1 con respecto al grupo que no recibió tratamiento (LIDO vs CON, $p=0,013$).
- En los pulmones del grupo tratado con lidocaína se observa una elevación del número de células con tinción positiva para Bcl-2 con respecto al grupo no sometido a isquemia-reperfusión (LIDO vs SHAM, $p= 0,008$). Este número elevado de células positivas para Bcl-2 también fue significativamente mayor en el grupo tratado con lidocaína respecto al grupo que no recibió ningún tratamiento (LIDO vs CON, $p=0,008$).
- No se encontraron diferencias significativas en la expresión de caspasa 9 a los 60 minutos de reperfusión entre los tres grupos de estudio.

5. CONCLUSIONES

En el presente modelo de autotrasplante pulmonar, la isquemia-reperfusión ya induce cambios en tejido pulmonar teñido con hematoxilina-eosina, a los 60 minutos de perfusión, destacando un mayor grado de infiltración por células del sistema monocito-macrófago y una mayor congestión capilar. Estos efectos son atenuados por la administración intravenosa de lidocaína. La tinción inmunohistoquímica con Anti-CD68 confirma que la isquemia-reperfusión induce un aumento de la infiltración por células del sistema monocito-macrófago en tejido pulmonar a los 60 minutos de la perfusión. Con la administración de lidocaína este incremento no es evidente. El estudio inmunohistoquímico muestra un significativo aumento de células neumocitarias y monocíticas que expresan la proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1; la administración de lidocaína parece prevenir este efecto. La administración intravenosa de lidocaína indujo un aumento de células que expresan la proteína Bcl-2, por lo que la lidocaína podría desempeñar un papel protector frente a la apoptosis inducida por isquemia-reperfusión pulmonar.

SUMMARY

1. INTRODUCTION

Ischemia-reperfusion injury (IRI) is defined as the process experienced by an organ temporarily undergoing a lack of bloodstream and the subsequent reperfusion with oxygenated blood. The lung IRI is a phenomenon of great clinical importance, for it directly affects early morbidity and mortality of this organ's transplantation. It is the main cause of primary graft failure, it increases the risk of acute rejection and, in the long term, of chronic rejection. The key phenomena in its etiopathogenesis are the inflammatory response and apoptosis. There are several therapeutic strategies to mitigate both of them and thus reduce its severe clinical consequences. Lidocaine, apart from its traditional use as a local and antiarrhythmic anesthetic, could have a modulating role on lung injury.

2. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

2.1 Hypothesis

With this experimental model, we hypothesize about the fact that the activation of cell and molecular mediators in lung IRI could appear in very early stages of the reperfusion through histological and immunohistochemical changes, and that the possible beneficial effects of intravenous lidocaine injection could be evidenced by the modification of these histopathological changes.

2.2 Objectives

The aim of this study is to evaluate a possible protective effect of intravenous lidocaine on inflammatory and apoptotic response of lung IRI. For this purpose, we use an experimental autotransplantation model on pigs. In this protocol, the pulmonary lobe undergoes an extended period of ischemia and a 60-minute reperfusion. Lung biopsies are obtained after reperfusion in order to assess the histological and immunohistochemical changes and the possible differences that may be observed when administering intravenous lidocaine throughout surgery.

3. MATERIAL AND METHODS

A group of six Large White pigs underwent an orthotopic lung autotransplantation through left pneumonectomy, *ex situ* cranial lobectomy, caudal lobe reimplantation and graft reperfusion for 60 minutes (CON group). Another group of six pigs of the same breed underwent the same procedure along with the administration of a 1,5-mg/kg/iv lidocaine bolus after induction and a 1,5-mg/kg/h intravenous lidocaine infusion throughout the rest of the procedure (LIDO group). We analyzed different hemodynamic and gasometric parameters during the intervention and, after 60 minutes of reperfusion of the transplanted lobe, we had lung biopsies to conduct histological and immunohistochemical studies. Moreover, six of the pigs underwent simulated surgery (SHAM group). In this group, we did not perform lung resection or intravenous lidocaine administration.

In the lung biopsies, we conducted a double histological study using hematosilin eosin staining and immunohistochemical techniques. In the hematosilin eosin analysis, we

assessed the degree of inflammation and the type of inflammatory cells, the degree of tissue edema and the degree of congestion. For immunohistochemical staining we used antibodies to CD68 antigens (mainly expressed in the monocyte/macrophage system), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (involved in the inflammatory response), Bcl-2 (antiapoptotic protein), and Caspase-9 (essential for the apoptotic effect).

4. RESULTS

Our experimental model showed that:

- There were no significant differences in the hemodynamic and gasometric parameters between the three groups.
- The pigs subjected to ischemia-reperfusion had an increase of the inflammatory infiltrate in the lung tissue 60 minutes after reperfusion (CON vs SHAM, $p=0,026$). In this inflammatory infiltration, the monocyte/macrophage lineage was identified as predominant cell (CON vs SHAM, $p=0,005$). The inflammation experienced by the group treated with intravenous lidocaine was lower than in the non-treated group (LIDO vs CON, $p=0,026$), as well as the monocyte/macrophage system cell infiltration (LIDO vs CON, $p=0,027$).
- Lung ischemia-reperfusion caused increased congestion in the lung tissue, which was greater in the lungs non-subjected to lidocaine administration compared to the simulated surgery group (CON vs SHAM, $p=0,005$).
- Ischemia-reperfusion in the lung tissue caused an increase in CD68-positive cells 60 minutes after reperfusion (CON vs SHAM, $p=0,002$). The lungs of the group treated

with lidocaine showed a reduction in CD68-positive cells compared to the untreated group (LIDO vs CON, $p=0,003$).

- Ischemia-reperfusion in the lung tissue caused an increase in MCP-1-positive cells 60 minutes after reperfusion (CON vs SHAM, $p=0,008$). The lungs of the group treated with intravenous lidocaine showed a reduction in MCP-1-positive cells compared to the untreated group (LIDO vs CON, $p=0,013$).

- The lungs of the group treated with lidocaine showed an increase on the number of Bcl-2-positive cells compared to the group that had not undergone ischemia-reperfusion (LIDO vs SHAM, $p=0,008$). This high number of Bcl-2-positive cells was also significantly higher in the group treated with lidocaine compared to the untreated group (LIDO vs CON, $p=0,008$).

- We did not observe significant differences in the Caspase-9 expression 60 minutes after reperfusion among the three groups.

5. CONCLUSIONS

In this lung transplantation model, ischemia-reperfusion inflicts changes in the lung tissue stained with hematosilin eosin 60 minutes after reperfusion, with a higher infiltration degree of the monocyte/macrophage system cells and a higher capillary congestion. These effects are mitigated by intravenous lidocaine administration. Immunohistochemical staining with anti-CD68 confirms that ischemia-reperfusion increases infiltration by monocyte/macrophage system cells in the lung tissue 60 minutes after reperfusion. With lidocaine administration, this increase was not clear. The immunohistochemical study shows a significant increase of pneumocyte and monocyte cells that express MCP-1; lidocaine administration seems to prevent such

effect. Intravenous lidocaine administration caused an increase in the number of cells expressing Bcl-2 protein. Hence, lidocaine could play a protective role against apoptosis induced by lung ischemia-reperfusion.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 SÍNDROME ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

El síndrome de isquemia-reperfusión (SIR) se define como el proceso que sufre un órgano sometido temporalmente a la falta de flujo sanguíneo y a la reperfusión posterior con sangre oxigenada. Esta división en dos fases conceptuales - la lesión causada por la isquemia y la lesión debida a la reperfusión - no es absoluta, ya que el daño celular en el órgano hipóxico se acentúa aún después de la restauración del aporte de oxígeno, lo que sugiere que los procesos que suceden en la reperfusión son la consecuencia de los que se inician durante la isquemia; ésta conduce a un estado proinflamatorio que aumenta la vulnerabilidad del tejido a la reperfusión y puede llevar a la necrosis celular o a la apoptosis.

La respuesta inflamatoria generada daña el órgano sometido a la isquemia (respuesta local) y también órganos distantes (respuesta sistémica) (1,2). Así, a nivel sistémico se produce acidosis metabólica, hipercaliemia, mioglobulinemia y mioglobinuria. En el pulmón, concretamente, se describe un aumento de la permeabilidad microvascular y una acumulación de neutrófilos, pudiéndose desarrollar el denominado edema pulmonar no cardiogénico (3,4).

A) Fase de isquemia

Sus lesiones están relacionadas con la ausencia de oxígeno y la conversión de metabolismo aerobio en anaerobio. Se caracteriza por una alteración metabólica a nivel celular. El primer efecto que se produce es una alteración de la membrana e inhibición de la bomba ATPasa sodio-potasio, lo que modifica la concentración de iones sodio,

potasio y calcio y altera el potencial de membrana. Se produce entonces edema celular y se activan fosfolipasas – que lesionan las membranas citoplasmática, mitocondrial y lisosomal -, proteasas, ATPasas – que aumentan la depleción de adenosina-trifosfato (ATP)- y endonucleasas – encargadas de fragmentar la cromatina -, conduciendo a la citolisis. La isquemia inhibe también la fosforilación oxidativa a nivel de la mitocondria, disminuyendo la formación de ATP y estimulando la glicolisis anaerobia. Se forman así ácido láctico e hidrogeniones que producen acidosis intracelular y activación de los enzimas de los lisosomas, hasta producirse la autolisis y muerte celular. El intento de mantener la homeostasis consume ATP, que es catabolizado a adenosina-difosfato (ADP) y adenosina-monofosfato (AMP). A su vez, el AMP se metaboliza a hipoxantina. Los acúmulos de xantino oxidasa y de sus sustratos - hipoxantina y xantina - durante el período de isquemia son los responsables de la lesión celular durante la reperfusión (5).

B) Fase de reperfusión

En esta fase el flujo sanguíneo se reinstaura: el oxígeno llega a la célula, al torrente sanguíneo pasan productos tóxicos desde el tejido isquémico y los mediadores inflamatorios se multiplican. Esta etapa está relacionada con la mayor parte de las lesiones que ocurren en el SIR, y se caracteriza fundamentalmente por estrés oxidativo, daño endotelial e intervención de polimorfonucleares. El estrés oxidativo es el estado en el que la cantidad de especies de oxígeno reactivo exceden la capacidad del sistema antioxidante endógeno. Las principales especies de oxígeno reactivo son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxil (6). La producción de radicales libres de oxígeno (RLO) es mediada por muchos sistemas enzimáticos, entre

los que destacan la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa y la xantina oxidasa.

2.2 SÍNDROME ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN PULMÓN

En el apartado anterior se ha hecho una exposición superficial de los fenómenos fisiopatológicos generales que se producen en el SIR. En éste se desarrollarán en detalle los mecanismos moleculares y celulares que entran en el juego en el SIR pulmonar.

El SIR pulmonar es un fenómeno de gran relevancia clínica, pues afecta directamente a la morbimortalidad temprana (primeras 72 horas) del trasplante de este órgano (5). La incidencia estimada de SIR tras el trasplante pulmonar en la literatura es del 41%, con una mortalidad a los 30 días de un 40%, frente a tan sólo un 7% en los pacientes que no han manifestado este síndrome (7). Es la primera causa de fallo primario del injerto pulmonar; aumenta el riesgo de rechazo agudo y, a largo plazo, de rechazo crónico por bronquiolitis obliterante. Además de esto, constituye la segunda causa más importante (tras el rechazo inmunológico) implicada en la pérdida del órgano trasplantado. Se presenta con daño alveolar inespecífico, edema pulmonar e hipoxemia. Radiológicamente se caracteriza por la aparición de infiltrados pulmonares. Histológicamente se considera que el edema pulmonar es el máximo exponente del daño tisular producido por SIR.

Como se ha expuesto en la introducción, el SIR se corresponde con una situación de anoxia-reoxigenación en un órgano. Sin embargo, en isquemias no prolongadas en pulmón, o en las fases iniciales de la misma, el oxígeno permanece en los alveolos, manteniéndose el metabolismo aerobio. Es decir, en el pulmón, las fases iniciales de isquémica o los episodios de corta duración se caracterizan por ausencia de flujo sanguíneo en presencia de oxígeno. Se debe diferenciar, por lo tanto, el estrés oxidativo por hipoxia, y el no hipóxico o por isquemia no prolongada, característico del pulmón. El endotelio parece ser uno de los principales responsables de esta respuesta no hipóxica. Esto se debe a que es altamente sensible a los cambios en las fuerzas del flujo sanguíneo y transformará estas variaciones en señales eléctricas y bioquímicas, que producirán depolarización de membrana y activación de la NADPH oxidasa, del factor de transcripción nuclear kappa B, de la óxido nítrico (NO) sintetasa dependiente de calcio/calmodulina y de células como macrófagos y neutrófilos, con una alta actividad NADPH oxidasa. Todo ello desencadenará la producción de RLO, la peroxidación lipídica y la producción de citoquinas, condicionando una respuesta inflamatoria orientada a la lisis celular (8,9).

El resultado final del SIR en pulmón es una forma de muerte celular combinada, caracterizada por la simultaneidad de necrosis y apoptosis (10). Como se expondrá en profundidad más adelante, la apoptosis es un mecanismo activo dependiente de energía y no inflamatorio. La necrosis, por el contrario, es un fenómeno no dependiente de energía, que favorece la respuesta inflamatoria. Varios autores demuestran que un porcentaje significativo las células del pulmón trasplantado sufren apoptosis durante el trasplante. En estudios animales, pulmones trasplantados después de tiempos cortos de isquemia fría (menor a 6 horas) tienen mínima lesión por isquemia-reperfusión y buena

función a pesar de exhibir muerte celular apoptótica de forma significativa. Los pulmones trasplantados después de largos períodos de isquemia fría (18 o 24 horas) muestran SIR severo con empeoramiento del intercambio gaseoso. Estos pulmones exhiben gran cantidad de muerte celular por necrosis. De hecho, se desconoce si la muerte celular por apoptosis en este contexto supone una respuesta protectora (la muerte quiescente de células severamente dañadas) o un proceso pernicioso que aumenta el daño por SIR mediante la muerte de células sólo mínimamente dañadas (11).

Tras esta breve introducción a las generalidades del cuadro, se detallarán a continuación las principales poblaciones celulares y mediadores inflamatorios implicados en el fenómeno, para concluir con un análisis detallado del mecanismo apoptótico en el SIR pulmonar.

A) Mediadores celulares de la inflamación

En el desarrollo del SIR están implicadas diferentes células capaces de generar una cascada de señales de iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria, con intervención de citoquinas, proteínas quimiotácticas y RLO, que finalmente culmina en el daño pulmonar. Entre las poblaciones celulares que participan en el SIR se encuentran tanto células del sistema inmune (linfocitos T, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos) como células naturales del pulmón (pertenecientes al epitelio alveolar y endotelial). La respuesta celular del SIR pulmonar puede dividirse en dos fases (12,13):

- **Fase temprana:** inmediatamente después de la reperfusión, mediada por la activación previa de los macrófagos durante la isquemia y liberación de citoquinas y otros mediadores.
- **Fase tardía:** se produce a las 24 horas de la reperfusión, potenciada por el reclutamiento de linfocitos y neutrófilos en el pulmón en el momento de la reperfusión.

I) Macrófagos: el concepto de sistema fagocítico mononuclear o sistema monocito-macrófago hace referencia al constituido por los macrófagos y sus precursores, los monocitos, quedando excluidos los polimorfonucleares y las células endoteliales. Los monocitos, tras formarse en la médula ósea, pasan a la sangre, donde permanecen un máximo de 72 horas. Tras ese período se unen a las células endoteliales mediante las proteínas de adhesión y se desplazan al interior del tejido, convirtiéndose en macrófagos. Los monocitos no tienen función específica, sino que constituyen una reserva móvil que después se convertirá en macrófago. Los macrófagos residentes (los que existen en un tejido determinado) no son activos. Presentan una morfología muy variada, pudiendo identificarlos por su receptor de membrana característico, CD68. En el SIR se activan ya durante la fase de isquemia e intervienen en la respuesta temprana postreperfusión. Liberan factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma, interleuquina 1 (IL-1) y proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1). En el pulmón, los macrófagos expresan fenotipos pro- y antiinflamatorias. Esto está relacionado con el hecho de que los macrófagos alveolares no están constreñidos a un único perfil de activación que determine si el tejido pulmonar terminará destruido o se recuperará. Funcionalmente, distintos subtipos de macrófagos pueden existir en el mismo tejido y desempeñar roles críticos tanto en la iniciación como en la recuperación de la inflamación (14). Los macrófagos alveolares tienen como función la vigilancia

inmunológica en la lucha contra patógenos inhalados y la regulación homeostática de la función tisular (como aclaramiento del surfactante, por ejemplo) (15).

El CD68 es una proteína glicosilada de membrana validada ampliamente como marcador de macrófago alveolar (16). No es patognomónico de esta cepa, pues se expresa también en otros macrófagos tisulares, células de Langerhans, monocitos, fibrocitos, células de Kupffer, osteoclastos, granulocitos y sus precursores (17). Sin embargo, aunque el CD68 es un marcador histológico usado rutinariamente en las líneas de macrófagos, su función específica en esas células continua sin esclarecer.

Los macrófagos residentes en el pulmón están implicados en las fases iniciales del SIR en este órgano. Arun Prakash y cols. (18) observaron, en un modelo *in vitro* de SIR pulmonar, que los macrófagos pueden actuar como centinelas o células-sensor que inician los primeros pasos del SIR. Hamid Akbarshahi y cols. (19) demostraron un aumento de la población de macrófagos pulmonares que expresaban CD68 en un modelo de daño pulmonar secundario a pancreatitis. Los mismos autores ya había asociado anteriormente un aumento en la expresión de CD68 a la activación de macrófagica (19). Otra explicación posible para la existencia de macrófagos CD68 en el SIR (además de la activación de macrófagos residentes) es el reclutamiento desde el torrente sanguíneo (20,21).

II) Linfocitos: predominantemente linfocitos T y *natural killer*. Se acumulan en la fase de reperfusión y participan en la fase tardía mediante la liberación de interferón gamma. Son activados por reactivos de oxígeno y citoquinas (22).

III) Neutrófilos: son células polimorfonucleares que intervienen a partir de las primeras 24 horas postreperfusión. Normalmente son células fagocíticas de corta vida, pero presentan una apoptosis inhibida en el daño pulmonar agudo (23). Se encargan de perpetuar el daño pulmonar, liberando radicales libres de oxígeno y produciendo una disfunción de la membrana epitelio-capilar que desencadenará aumento de permeabilidad microvascular y edema, llegando incluso al daño tisular irreversible. Estas células son activadas de forma tardía, a partir de cuatro horas postreperfusión (*período neutrófilo dependiente*), mostrando de esta forma una escasa participación en las primeras horas, donde los macrófagos jugarán el papel primordial (*período neutrófilo independiente*). El reclutamiento y activación de neutrófilos es esencial en el daño pulmonar, pues estas células lo perpetúan liberando RLO, enzimas proteolíticas y otros mediadores proinflamatorios (24), a la vez que modifican la respuesta inflamatoria a través de la modulación de la producción de citoquinas de otras células implicadas, como los macrófagos alveolares (25).

IV) Células epiteliales alveolares (neumocitos tipo I): La pérdida de la integridad epitelial en el daño pulmonar tiene importancia tanto en el desarrollo como en la posterior recuperación del pulmón dañado. En condiciones normales, la barrera epitelial es mucho menos permeable que la endotelial y por tanto, el daño epitelial contribuye al edema alveolar, con exposición de sustancias de la matriz extracelular que interactúan con macrófagos alveolares (26).

V) Neumocitos tipo II: liberan citoquinas proinflamatorias, proteínas quimiotácticas y promueven la infiltración tisular por neutrófilos (27).

VI) Células endoteliales: El aumento de permeabilidad endotelial constituye la primera causa de edema en el SIR. Las células endoteliales también participan en el daño tisular mediante la producción de RLO durante el estrés oxidativo a través de la vía NADPH oxidasa, aumentando la concentración de reactivos de oxígeno durante la fase de reperfusión (27,9).

B) Mediadores moleculares de la inflamación

En la fisiopatología del daño pulmonar por SIR intervienen tanto las células activadas como los mediadores inflamatorios que producen:

I) Citoquinas/quimioquinas: proteínas secretadas por los macrófagos y secundariamente por linfocitos T. Juegan un papel importante en el daño por isquemia reperfusión en hígado, riñón, corazón, intestino delgado, piel y pulmón.

- **IL-1:** la interleuquina-1 es una proteína de 153 aminoácidos producida predominantemente por monocitos y macrófagos activados, aunque ha sido también aislada en queratinocitos, células endoteliales, neutrófilos, fibroblastos, y células de músculo liso. Se presenta en dos formas, denominadas IL-1 α e IL-1 β . Ambos polipéptidos ejercen las mismas funciones biológicas y se unen al mismo receptor de membrana celular, pero mientras la IL-1 β se secreta al medio extracelular, la IL-1 α permanece unida a la membrana de la célula que la produce. La acción principal de la IL-1 es proinflamatoria y muy similar a la del TNF- α . Está implicada en la liberación de histamina por parte de los mastocitos y en la de otros mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, leucotrienos e interleuquina-8. En el SIR pulmonar está relacionada

con la síntesis de RLO, con la oclusión trombótica de la microcirculación pulmonar y con el aumento de la permeabilidad vascular. La activación local de esta citoquina parece ser responsable del desarrollo de daño pulmonar agudo. En el pulmón las citoquinas son producidas por células residentes, como los macrófagos alveolares, neumocitos, células endoteliales y fibroblastos, o por neutrófilos, linfocitos y plaquetas que llegan al pulmón en respuesta a estímulos locales o sistémicos (28). Prácticamente todos los tejidos pueden producir IL-1, aunque los niveles más elevados se encuentran en el hígado, bazo y pulmón. Deh-Ming Chang y cols. (29), en un modelo de SIR en ratas, postularon que las citoquinas son mediadores cruciales de la interacción entre leucocitos y células endoteliales. La IL-1 – al igual que el TNF- α - modulan el proceso de extravasación y localización de leucocitos en los puntos de inflamación. Parece que la IL-1 está implicada en los estadios tempranos de la reperfusión (30,31).

- **TNF- α** : el factor de necrosis tumoral α es una citoquina de 157 aminoácidos, secretada por una amplia variedad de células, entre las que se incluyen macrófagos, monocitos, células T, células *natural killer* y neutrófilos (32). Es un mediador inflamatorio local y sistémico, implicado en el shock séptico y la coagulación intravascular diseminada. Potencia la liberación de citoquinas y quimioquinas, aumenta la permeabilidad vascular, activa el endotelio, libera NO, modula del reclutamiento y la activación de neutrófilos y produce efectos variables en el crecimiento y la muerte celular. Se ha identificado TNF- α en SIR de hígado, corazón, riñón e intestino (33). En estas localizaciones se ha demostrado que potencia el daño tisular, y que su bloqueo limita la lesión mediante la disminución en el reclutamiento de neutrófilos. Otros estudios han definido el papel funcional del TNF- α en el daño pulmonar agudo no isquémico secundario a aspiración

de lipopolisacárido, deposición de complejos de inmunoglobulina G y modelos con anticuerpos antiglomerulares, todos ellos neutrófilos-dependientes.

El TNF- α es un elemento esencial en la denominada *hipótesis de las citoquinas*, desarrollada fundamentalmente en el SIR miocárdico (34). Está demostrado que el TNF- α tiene efectos beneficiosos y deletéreos en los miocitos, protegiéndolos de la apoptosis del SIR y manteniendo la homeostásis tisular, pero también induciendo disfunción microvascular por la cascada del NO.

Ya se ha explicado que el daño vascular del SIR pulmonar es bifásico; tiene una fase precoz, neutrófilo independiente, que ocurre a los 15 minutos de la reperfusión, y una tardía, dependiente del reclutamiento de macrófagos y de su activación. Como la fase precoz se da mucho antes de la infiltración por neutrófilos, es muy probable que sea dependiente de células residentes del tejido, como los macrófagos alveolares. Tanto los macrófagos alveolares residentes en la interfase aire-tejido del pulmón, como los macrófagos intersticiales que rodean los vasos, son las células inmunológicas respondedoras tempranas y rápidas ante una gran variedad de estímulos. El papel de los macrófagos alveolares en el desarrollo florido del daño de reperfusión es controvertido, aunque se postula que contribuyen a iniciar, a través del TNF- α , la cascada de eventos que conducen al daño por reperfusión.

- **Interleuquina 10:** es una citoquina antiinflamatoria que regula el nivel de TNF- α producido y la actividad de diferentes moléculas de adhesión.

II) Moléculas de adhesión: son proteínas sintetizadas en el endotelio durante la fase de isquemia. Están constituidas por tres grandes familias: integrinas, selectinas e inmunoglobulinas. La isquemia-reperfusión conduce a la activación, quimiotaxis, adhesión y transmigración leucocitaria en el endotelio, procesos en los que participan estas citoquinas especializadas. También están implicadas en la regulación de la adhesión de moléculas, en la liberación enzimática y en la formación de RLO (35,36,37).

- **MCP-1:** es una quimioquina compuesta por 76 aminoácidos, mediadora de la respuesta precoz en el daño pulmonar agudo, donde se ocupa del reclutamiento de monocitos, células T y *natural killers*. Las quimioquinas se aislaron por primera vez en 1977 y desde entonces se han indentificado más de 50. Se subdividen en cuatro familias según el número y espacio del residuo de cisteína conservada en el N-terminal de la molécula. De esta forma son nombradas CXC, CC, CX₃C y C. Se secretan en respuesta a señales de citoquinas proinflamatorias y juegan un papel primordial en el reclutamiento selectivo de monocitos, neutrófilos y linfocitos. Se agrupan en dos subfamilias funcionales: inflamatorias y homeostáticas. Las quimioquinas inflamatorias controlan el reclutamiento de leucocitos en la inflamación y daño tisular, mientras que las homeostáticas cumplen tareas relacionadas con la navegación de leucocitos a órganos linfoides secundarios, a la médula ósea y al timo durante la hematopoyesis. MCP-1 fue la primera CC quimioquina descubierta en humanos. Se expresa en macrófagos, fibroblastos, endotelio, músculo liso y células epiteliales y modula la producción de citoquinas, la expresión de moléculas de adhesión y la proliferación de células mononucleares. Está implicada en la activación de monocitos y en su reclutamiento en focos de inflamación activa (38). Desempeña un rol esencial en el SIR

(39) - probablemente relacionado con la IL-1, TNF- α y los RLO -, así como en otras patologías inflamatorias, como la encefalomiелitis autoinmune, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis pulmonar, peritonitis aguda, artritis, aterosclerosis o miocarditis (40,41,42). Varios estudios en trasplante pulmonar confirmaron el aumento en la producción de MCP-1 en casos de disfunción primaria del injerto (43), y algunos de ellos calificaron esta elevación de marcador independiente de rechazo del trasplante pulmonar. Se ha demostrado el aumento de sus niveles séricos en varios modelos de daño pulmonar animal (13, 44), así como su papel promotor de la respuesta inflamatoria sistémica en respuesta a la hipoxia alveolar (45). D'Angio y cols. (46) comprobaron, en un modelo animal, la expresión aumentada de interleuquina 8 y de MCP-1 (proteínas atrayentes de neutrófilos y monocitos, respectivamente) en el daño pulmonar inducido por hiperoxia mantenida. Goodman y cols. (47) describieron, en el lavado broncoalveolar de pacientes con síndrome de distrés respiratorio, que existe un aumento significativo de distintas citoquinas inflamatorias, incluida MCP-1, sin importar la duración del cuadro clínico, y con niveles proporcionales a la severidad del daño pulmonar. También Lin y cols. encontraron sobreexpresión de MCP-1 en el lavado broncoalveolar de pacientes con edema secundario a síndrome de distrés respiratorio del adulto, correlacionándose con la gravedad del daño pulmonar (48).

III) Sistema del complemento: término colectivo usado para proteínas de membrana celular y factores plasmáticos. Su activación produce contracción del músculo liso y aumento de permeabilidad vascular, induciendo la degranulación de células fagocíticas, mastocitos y basófilos (5).

IV) Factores de Transcripción: como el factor de factor de transcripción nuclear kappa B.

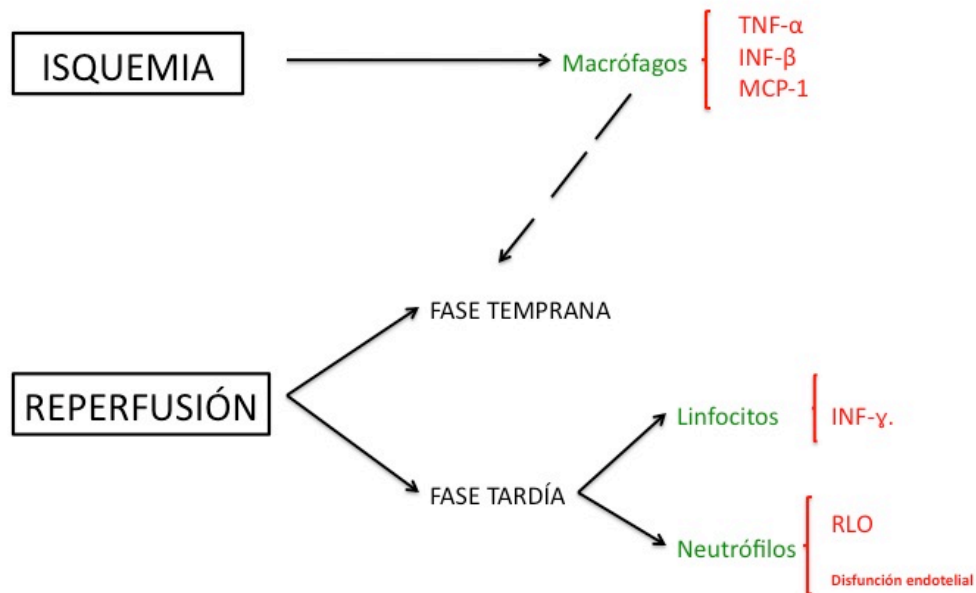


Figura 1. Principales mediadores celulares y moleculares del SIRS. INF-β: Interferón beta. INF-γ: interferón gamma.

C) Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo activo dependiente de energía, genéticamente determinado y sin presencia de inflamación, mediado por la cascada de las caspasas y diferentes procesos mitocondriales. La necrosis, por el contrario, es un fenómeno no dependiente de energía, que favorece la respuesta inflamatoria y que se acompaña de un pérdida de la integridad de la membrana plasmática y de disrupción nuclear (49). La morfología final que exhibe la célula depende de las condiciones en que se ha producido

la muerte celular y la disponibilidad de sustrato (de ATP, por ejemplo). El término *apoptosis* fue acuñado para describir las características de las células que morían espontáneamente, como la generación de burbujas celulares (*blebbing*), la condensación de la cromatina y la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática. Estos cambios conformacionales producen la activación rápida de macrófagos con capacidad fagocítica, lo que hace que el número de células apoptóticas detectables en un tejido en un momento dado sea mucho más reducido de lo esperado tras una noxa, y se limita la liberación de sustancias inflamatorias intracelulares, ya que se respeta la integridad de la membrana celular (50,51).

En la fisiopatología de la apoptosis intervienen dos vías principales, la intrínseca y la extrínseca. Ambas están mediadas por las principales proteínas encargadas de ejecutar la apoptosis: las caspasas. Se han identificado once caspasas en la especie humana (caspasas 1-10 y 14), de las que siete que participan activamente en la apoptosis, entre las que destaca caspasa 9 (52,53). Éstas son clasificadas en *caspasas inflamatorias* (implicadas en la producción de citoquinas) y *caspasas mediadoras de la apoptosis*. Estas últimas se dividen, a su vez, en *caspasas iniciadoras* (como la caspasa 9) y *caspasas ejecutoras*. Todas las caspasas comparten similitudes en su secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato. La mayoría se localizan en el citoplasma. Con excepción de la caspasa 9, que parece activarse por cambio conformacional, el resto se activan por proteólisis.

I) Ruta intrínseca: Esta es la vía más conservada evolutivamente. La noxa altera las proteínas de la superfamilia de los Bcl-2, que inducen la apoptosis actuando sobre las mitocondrias. En última instancia, dos de estas proteínas, Bax y/o Bak, provocan la

pérdida del potencial mitocondrial y la activación citosólica de proteasas, denominadas caspasas (54).

- **Proteínas de la superfamilia Bcl-2:** El primer miembro identificado fue la proteína antiapoptótica Bcl-2. Se conocen actualmente unas veinte proteínas de esta superfamilia, unas con función antiapoptótica y otras proapoptótica (55,56). Los miembros de esta familia se pueden subdividir en tres grupos de acuerdo con su estructura y función:

a) **Proteínas antiapoptóticas:** Bcl-2 y sus homólogos, Bcl-xL, y Mcl-1, inhiben la apoptosis (57).

b) **Proteínas proapoptóticas multidominio:** algunos miembros de esta subfamilia son Bax, Bak y Mtd.

c) **Proteínas sólo-BH3:** se han identificado unas diez proteínas de esta subfamilia (Bim, Bad, Bid, Bik, Hrk, PUMA, Noxa, etcétera). Las proteínas *sólo-BH3* no pueden ejercer su acción apoptótica en ausencia de Bax y Bak, lo que sugiere que su diana principal son estas proteínas. Se cree que las proteínas *sólo-BH3* funcionarían como sensores del daño celular y su activación constituiría la primera etapa de la apoptosis mitocondrial (58).

- **Caspasas:** como consecuencia de la acción secuencial de las proteínas *sólo-BH3* y de Bax/Bak se produce la liberación al citosol de citocromo c desde la mitocondria. El citocromo c forma, junto a otras proteínas, un gran complejo llamado *apoptosoma*, que recluta a la caspasa 9 e inicia una serie de reacciones proteolíticas conocidas como la

cascada de las caspasas (59). Las caspasas activas ocasionan la rotura controlada de proteínas y estructuras celulares, desmontando ordenadamente la célula y dando lugar al fenotipo apoptótico.

El RNA mensajero de caspasa 9 es primero traducido en procaspasa 9, la cual, en condiciones apoptóticas, se convierte en la enzima activada, que participa directamente en la formación del apoptosoma (60). Su expresión es ubicua, predominando en corazón y moderadamente en hígado, músculo esquelético y páncreas. Se localiza, sobre todo, en el citosol, pero también se ha aislado en la mitocondria y en el núcleo.

II) Ruta extrínseca: Mediante esta vía, la apoptosis es inducida por la unión de una proteína extracelular (*mensajero mortal*) a su receptor (*receptor mortal*). Los receptores mortales pertenecen a la superfamilia del receptor del TNF. La ruta mejor conocida es la iniciada por el ligando de la proteína Fas (FASL). La unión de varias moléculas de caspasa 8 a un complejo de proteínas asociado a Fas ocasiona su autoactivación proteolítica, la activación ulterior de otras caspasas y, en último término, la fragmentación del DNA (9,50,51).

III) Apoptosis inducida por los linfocitos citotóxicos: los linfocitos citotóxicos constituyen la defensa primordial del organismo contra las infecciones virales y el desarrollo tumoral. Estos linfocitos, a través de receptores de superficie, reconocen a las células infectadas o transformadas, lo cual inicia su proceso de activación que culmina con la eliminación de la célula diana, normalmente por apoptosis. La citotoxicidad depende de dos mecanismos que conectan con las dos principales vías de apoptosis celular. Un mecanismo se basa en la exocitosis de gránulos preformados que contienen

proteínas tóxicas (perforina, granzimas A y B, granulicina) y el otro depende de la expresión de FASL en el linfocito y de Fas en la célula diana (59).

IV) Relevancia de la apoptosis en el SIR de pulmón: la apoptosis secundaria al SIR ha sido ampliamente descrita en pulmón (11) y otros órganos, como corazón (61), hígado (62), intestino delgado (63) y riñón (64). Parece que la duración de la fase de isquemia se correlaciona con el grado de activación de la cascada apoptótica (65). Fischer y cols. (11,66) evidenciaron que un número importante de células sufrían apoptosis durante el trasplante pulmonar, y Syed y cols. (10) observaron que entre las poblaciones celulares que sufrían este proceso había abundantes células endoteliales, linfocitos y neumocitos tipo II. Estos mismos autores describieron que este proceso apoptótico está mediado por la vía de las caspasas, y que en él participan, al menos, caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9. El aumento significativo y dramático en la actividad de caspasa 8 y 9 sugiere que ambas vías, la extrínseca y la intrínseca están implicadas en el fenómeno.

V) Métodos de detección de apoptosis en SIR pulmonar: existen muchas características bioquímicas identificadas tradicionalmente como indicadoras de apoptosis, como la activación de caspasas (medida mediante ensayos de actividad enzimática), su detección y la de sus sustratos por Western Blot o la externalización de la fosfatidilserina determinado por citometría de flujo (67). Durante años, los cambios en la arquitectura nuclear que se producen en las células apoptóticas - como la segmentación del núcleo - han sido los marcadores citológicos más específicos de apoptosis. Sin embargo, estos caracteres nucleares no son siempre fácilmente interpretables en muestras rutinarias de parafina. Por ejemplo, la fragmentación del

DNA detectada por electroforesis ha sido clave en la identificación de apoptosis, pero no se puede realizar en células individuales del tejido. El método TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling*), en cambio, sí evalúa el índice de apoptosis en células individuales que sufren degradación extensa del DNA en los últimos estadios de la apoptosis. El método ISNT (*in situ nick translation assay*) fue publicado por primera vez por Jonker, en 1993, y está basado en que la DNA polimerasa I cataliza la incorporación de deoxirribonucleótidos a lo largo de la cadena de DNA y evidencia rupturas simples de DNA. Este método de detección de apoptosis puede usarse en la superficie del tejido o en moléculas intracelulares. Como contrapartida, hay que señalar que estos dos últimos sistemas – el TUNEL y el ISNT – pueden malinterpretarse, ya que la necrosis también genera hebras de DNA fragmentado. Pueden usarse técnica más específicas, como las que detectan cambios morfológicos en la superficie – por ejemplo, el microscopio *lapso de tiempo* -, pero no pueden usarse en material fijado. Además, estos cambios sensibles en la composición de la superficie - como la externalización de residuos de fosfolípido con annexin V - ocurren sólo en un porcentaje de todas las células apoptóticas y no pueden aplicarse en materiales fijados.

2.3 ESTRATEGIAS DE PRESERVACIÓN PULMONAR DURANTE EL TRASPLANTE

El SIR es un fenómeno de gran relevancia clínica, que se da en los trasplantes de órganos, cirugías reconstructivas con isquemia prolongada, situaciones de bajo gasto

cardiaco y shock, embolias, infartos cerebrovasculares o en síndromes de aplastamiento. Sin embargo, el paradigma del SIR es el que se produce en el órgano trasplantado. En éste existen dos fases de isquemia (68):

1. **Isquemia caliente**, producida por la interrupción del flujo sanguíneo al órgano que todavía está dentro del organismo, y en la que la temperatura de éste se mantiene al mismo nivel que tiene habitualmente.

2. **Isquemia fría**, desarrollada en el órgano ya explantado y mantenido a una temperatura de 4 °C para enlentecer su metabolismo. La isquemia fría es necesaria para el almacenamiento del órgano desde el momento que se extrae hasta que se implanta en el receptor. La hipotermia provoca un descenso de la tasa metabólica y disminuye la destrucción de componentes celulares esenciales.

Ya se he mencionado la importancia del SIR en pulmón, en procedimientos como el *bypass* cardiopulmonar, reanimaciones por parada cardíaca, embolia pulmonar o trauma torácico. Se trata de un fenómeno crucial en el trasplante pulmonar, pues se relaciona con fallos del injerto hasta en un 15% de los casos, y constituye una causa importante de morbilidad postrasplante por producir fallo pulmonar agudo y/o síndrome de distrés respiratorio del adulto (9). Entre las estrategias terapéuticas existentes para disminuir el daño pulmonar por SIR destacan:

A) Soluciones de preservación pulmonar: El objetivo de las soluciones de preservación es minimizar el edema celular, prevenir la acidosis, disminuir la entrada de calcio en la célula, prevenir la expansión del espacio intersticial, rprevenir el daño inducido por

radicales libres y aportar ATP. La solución de Wisconsin es una solución de tipo intracelular (contiene cifras elevadas de potasio y poco sodio), con alta viscosidad, efecto tampón (gracias a su contenido en fosfato y sulfato) y alta presión coloidosmótica (por el hidroxietil). Posee sustancias antioxidantes (glutathion y alopurinol) y citoprotectoras (como magnesio, dexametasona e insulina) (69).

- Temperatura y ventilación: La expansión pulmonar con oxígeno y en hiportemia durante el período de isquemia ha demostrado proteger al órgano del SIR por tres mecanismos: mantiene el metabolismo aeróbico, preserva la integridad del surfactante y mantiene el transporte epitelial de fluido (69).

- Óxido Nítrico: El NO endógeno disminuye después del fenómeno de isquemia-reperusión pulmonar en humanos. Se ha usado satisfactoriamente NO en la práctica clínica para el tratamiento de SIR instaurados, pero su uso en la prevención del mismo durante las fases de isquemia-reperusión permanece en controversia (70).

- Prostaglandinas: la prostaglandina E1 resulta beneficiosa cuando se administra junto a soluciones intracelulares (71).

- Precondicionamiento: los órganos sometidos a episodios leves de estrés generan tolerancia a daños posteriores prolongados. Se han descrito diferentes tipos: leves períodos de isquemia (precondicionamiento isquémico) (72,73), de aumento de temperatura (precondicionamiento hipertérmico) (74), de administración de agentes farmacológicos (precondicionamiento químico) (75) y de gases anestésicos halogenados (precondicionamiento anestésico) (76,77).

Además de las estrategias arriba enumeradas, numerosos estudios avalan el uso de lidocaína en la prevención del SIR, herramienta terapéutica a la que se dedican los siguientes apartados.

2.4 LIDOCAÍNA

La lidocaína o la 2-dietilamino-2,6-dimetilacetanilida es un anestésico local (AL) de tipo amida. Sintetizada por Nils Löfgren en 1943, fue el primer derivado monoamino introducido en la práctica clínica y el único AL que puede administrarse en la actualidad de forma intravenosa.

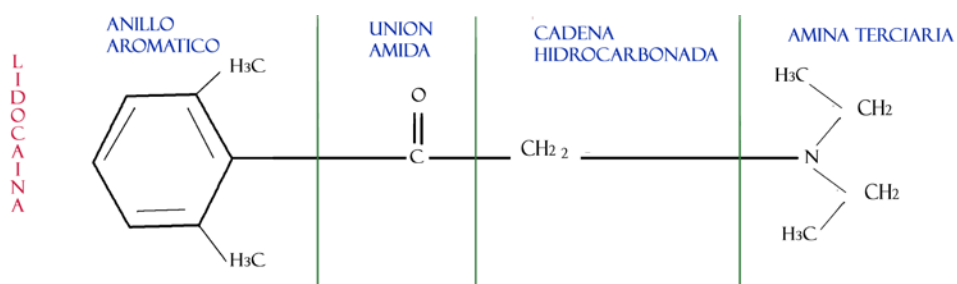


Figura 2. Estructura química de la lidocaína.

Comparte su principal mecanismo de acción con otros AL, es decir, bloquea la propagación del impulso nervioso impidiendo la entrada de iones de sodio a través de la membrana nerviosa. Además, disminuye la despolarización, automatismo y excitabilidad en los ventrículos durante la fase diastólica mediante acción directa sobre los tejidos, sin involucrar al sistema autónomo.

De los mecanismos de acción de la lidocaína mencionados antes derivan sus dos usos principales en la práctica clínica: como AL y como antiarrítmico (78). En los últimos años, sin embargo, se ha postulado la existencia de otros efectos clínicos más novedosos: analgésico (disminuye el dolor visceral en numerosas cirugías abdominales, facilitando la recuperación precoz, el restablecimiento de una función intestinal normal y disminuyendo la estancia hospitalaria), antiinflamatorio y antiapoptótico (79,80).

Así, Lahat y cols. (81) estudiaron el efecto antiinflamatorio de la lidocaína en muestras de sangre periférica de humanos, constatando que la lidocaína inhibe la producción por parte de los linfocitos T de tres citoquinas principales: interleuquina-2, TNF- α e IFN. También se ha demostrado que inhibe la activación y migración de polimorfonucleares en áreas inflamadas, disminuyendo su movilidad y adhesión, lo que atenúa la expresión de citoquinas y radicales libres. Además, presenta propiedades antiinflamatorias significativas, disminuyendo la liberación de TNF- α (2) o de citoquinas inflamatorias, como interleuquina-6, interleuquina-8 e interleuquina-1RA (antagonista del receptor de IL-1) a través de la inhibición de la activación de los neutrófilos (82,83).

Los efectos de la lidocaína en cuadros inflamatorios de pulmón también han sido ampliamente estudiados. La fisiopatología del daño pulmonar agudo (y de su forma más grave, el síndrome de distrés respiratorio) incluye anormalidades de la función del surfactante e inflamación pulmonar. Huang y cols. (84) observaron que la lidocaína mejora la oxigenación y la *compliance* pulmonar. En la patogénesis del daño pulmonar inducido están implicados numerosos factores, humorales y celulares (macrófagos, neutrófilos, plaquetas, citoquinas, metabolitos del ácido araquidónico) que producen un aumento de la permeabilidad vascular (85). Estos efectos son atenuados por la adición

de lidocaína, que disminuye el conteo de polimorfonucleares en lavado broncoalveolar y la liberación de sustancias proinflamatorias (albúmina, C3a, C5a, TNF- α , IL-1, tromboxano B2...). En estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha observado que, en cerdos sometidos a cirugías de resección pulmonar con lidocaína intravenosa, hay una disminución de la expresión de TNF- α , de forma tanto local como sistémica. Este resultado apunta a que este fármaco puede modular el daño pulmonar secundario a ventilación unipulmonar (2).

En conclusión, son muchas las situaciones clínicas en las que el pulmón se ve sometido a períodos de isquemia de distinta duración, y con ellos al riesgo de sufrir SIR. El daño pulmonar por SIR está relacionado con la activación de mediadores celulares y vías moleculares de inflamación y apoptosis que se inician en el período de isquemia y se potencian y retroalimentan durante la reperfusión. La inflamación y la apoptosis pueden y deben ser estudiadas en modelos experimentales, en los que ensayar estrategias terapéuticas que nos ayuden, tras un proceso traslacional a ensayos clínicos, a disminuir las graves consecuencias que el SIR pueden tener en los pacientes afectados.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

El SIR es un proceso patológico de graves consecuencias clínicas. Durante el periodo de isquemia tisular, se activan mediadores celulares y moleculares que inician procesos de inflamación y apoptosis que son potenciados al producirse la reperfusión del órgano. En parte, estos procesos se activan para proteger al órgano y restaurar su integridad histológica y funcional pero, en muchas ocasiones, también conducen a un daño pulmonar y sistémico de consecuencias potencialmente letales. La lidocaína, un fármaco conocido como anestésico local y antiarrítmico, se presenta recientemente como un posible modulador del daño pulmonar en diferentes situaciones clínicas. En este estudio, planteamos la hipótesis de que la activación de estos mediadores celulares y moleculares en el SIR pulmonar podría manifestarse en fases muy precoces de la reperfusión mediante cambios histológicos e inmunohistoquímicos, y que los posibles efectos beneficiosos de la administración intravenosa de lidocaína podrían ponerse de manifiesto en la modificación de estos cambios histopatológicos.

3.2 OBJETIVOS

Para intentar demostrar la hipótesis planteada, se realizó un protocolo experimental de isquemia-reperfusión pulmonar. El procedimiento experimental se basa en un modelo de autotrasplante pulmonar en cerdo. El lóbulo pulmonar es sometido en este protocolo

a un periodo prolongado de isquemia y una breve reperfusión (60 minutos). El objetivo principal del estudio es obtener biopsias pulmonares tras la reperfusión para evaluar los cambios histológicos e inmunohistoquímicos al principio de la reperfusión y las posibles diferencias que puedan observarse al administrar lidocaína intravenosa durante el procedimiento quirúrgico.

Los objetivos específicos para alcanzar el objetivo principal fueron:

1. Analizar, en el pulmón sometido a isquemia-reperfusión, si, tras 60 minutos de reperfusión se observan cambios microscópicos morfológicos, y si la administración de lidocaína intravenosa los modifica.
2. Estudiar si en este modelo de isquemia-reperfusión pulmonar, mediante estudios inmunohistoquímicos, se puede detectar infiltración monocito-macrofágica en el pulmón y si la administración de lidocaína intravenosa afecta a esa infiltración.
3. Analizar si la expresión inmunohistoquímica de MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) se modifica precozmente durante la reperfusión, si se asocia con el grado de infiltración por monocitos-macrófagos y si la administración de lidocaína intravenosa altera estos efectos.
4. Estudiar si, en este modelo, la respuesta apoptótica secundaria a la isquemia-reperfusión pulmonar se manifiesta en la expresión de la proteína proapoptótica caspasa 9 o la proteína antiapoptótica Bcl-2, y si administración de lidocaína intravenosa modula esta respuesta.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para estudiar el efecto de la lidocaína intravenosa sobre la respuesta inflamatoria y apoptótica secundaria a isquemia-reperfusión pulmonar se diseñó un modelo experimental en cerdo de autotrasplante pulmonar ortotópico mediante neumonectomía izquierda, lobectomía craneal *ex – situ*, reimplantación del lóbulo caudal y reperfusión del mismo durante 60 minutos. Durante el procedimiento se analizaron diferentes parámetros hemodinámicos y gasométricos y, tras los 60 minutos de reperfusión del lóbulo trasplantado, se realizaron biopsias pulmonares del mismo para estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

4.1 MATERIALES

A) Material biológico

Se han utilizado 18 cerdos de raza Large White con un peso medio de 39 kilos. Los animales proceden de la granja que el Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario de la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid posee en el Complejo Agropecuario de Aranjuez (finca *La Chimenea*). El Instituto Tecnológico de Desarrollo Agrario es un establecimiento autorizado inscrito con el número EX 013-C en el Registro Oficial de Establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales para la experimentación y otros fines científicos de la Comunidad de Madrid según la Orden de 4 de agosto de 1989 (BOCM de 24 de agosto). En este centro los cerdos se alojan en instalaciones construidas específicamente para ganado porcino, similares a las de una granja convencional, que garantizan su bienestar. El traslado del cerdo desde la

granja de Aranjuez hasta las instalaciones de la UMCE se realiza 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, en una jaula individual, que alberga al animal hasta el momento de la intervención. El animalario dispone de un ambiente controlado con 20-22 °C y humedad relativa del 55%. El manejo de los animales se ha llevado a cabo siguiendo la normativa legal según el Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre, BOE de 21 de Octubre de 2005 Animales, protección de los utilizados para experimentación y otros fines científicos (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) que incorpora las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los estados miembros de la CEE respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, de la Directiva del Consejo 86/609/CEE (Leg. CC.EE. 4390) aprobada el 24 de Noviembre de 1996. El estudio se ha realizado en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, con número de registro EX/017-U. Fue concedida la aprobación del Comité de Experimentación Animal y del Comité de Investigación de la institución.

B) Aparatos y material fungible

I) Transductores de presión desechables Abbott IBP (Abbott, Irlanda) para monitorizar las variables hemodinámicas del animal.

II) Tubo endotraqueal: Para la intubación orotraqueal se utilizó un tubo estándar del número 6,5 modelo Murphy con balón, que se posicionaba inicialmente por encima de la carina, sin ocluir el bronquio lobar superior derecho. El tubo se aboca a glotis fiado con fiador Rusch, y éste se retira antes de traspasar las cuerdas vocales. Cuando se

inicia la ventilación unipulmonar, el tubo del 6,5 es seccionado en su parte superior y unido mediante esparadrapo de tela a un tubo del número 9 modelo Murphy con balón.

III) Catéteres vasculares: Se utilizan para canalizar las arteria y vena femorales (8 y 7 F respectivamente).

IV) Catéter PiCCO (Pulse Contour Cardiac Output; Pulsion Medical Systems ®, Munich, Alemania): Se trata de un sistema de medida de varios parámetros hemodinámicos que analiza la onda del registro invasivo de la presión arterial. Este monitor combina la medida puntual del gasto cardiaco (GC) por termodilución con el cálculo continuo del gasto cardiaco a través del análisis matemático de la onda de presión arterial. Se requiere la canalización de una vena central y de una arteria. El dispositivo consta de los siguientes componentes: catéter venoso central, catéter arterial con termistor específico de PiCCO, sensor de temperatura, cable de sensor de temperatura del inyectable, cable interfaz de temperatura arterial, cable monitorización arterial, transductor de presión específico de PiCCO, monitor de PiCCO, solución de inyección estéril frío, jeringas de veinte centilitros y sistema presurizado para mantenimiento arterial.

C) Disposición de los componentes y calibración

Al monitor PiCCO se conectarán el cable de sensor de temperatura del inyectable (que a su vez se unirá al catéter venoso central, a través de un sensor de temperatura) y el cable interfaz de temperatura arterial, unido al catéter arterial con termistor y a un transductor de presión.

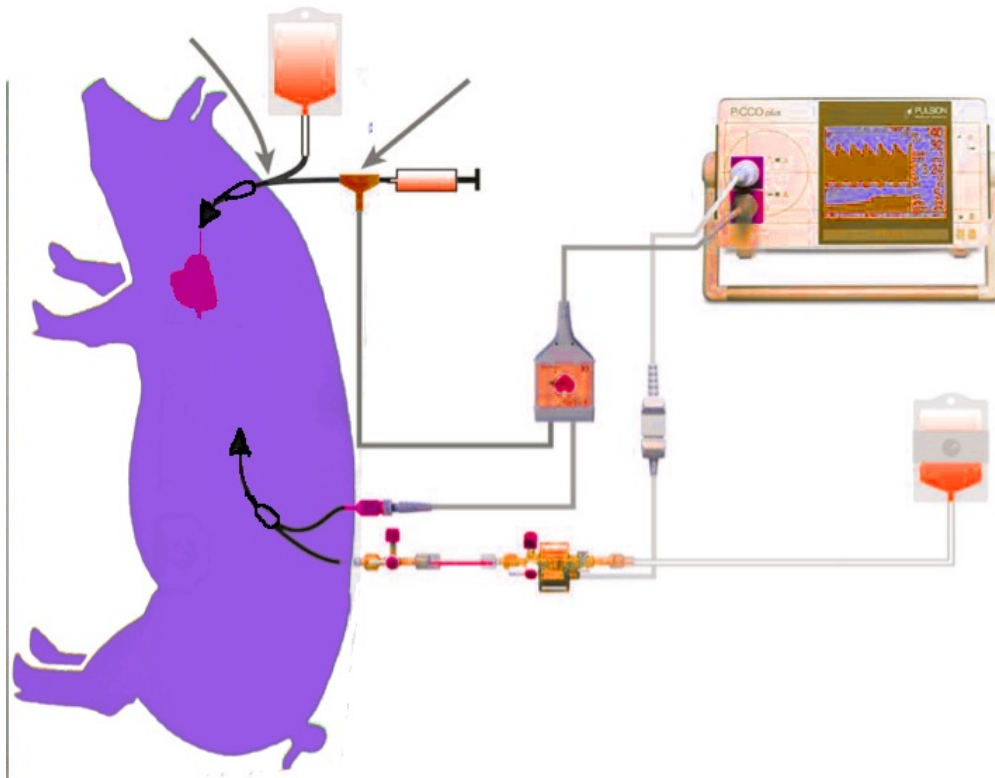


Figura 3. Monitor PiCCO conectado al animal a través de dos accesos vasculares, uno arterial y otro venoso.

D) Quirófano e instalaciones

Todos los experimentos fueron realizados en el quirófano de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Dicho quirófano incluye dos mesas quirúrgicas, cuatro lámparas quirúrgicas de alta intensidad y equipo de instrumental quirúrgico estándar así como material específico de cirugía torácica.

En cuanto al material anestésico, el quirófano está equipado con un desfibrilador con palas externas e internas Life Pulse (HVE, Miami, USA), un capnógrafo Ohmeda 5250

RGM (General Electric Health Care, Estados Unidos), un respirador modelo Servo Ventilator 900 C (Siemens), un analizador de gases GEM Premiere 5000 y un Monitor de PiCCO (Edwards, Irving, California, Estados Unidos).

4.2 MÉTODOS

A) Protocolo anestésico

El animal es sometido a 18 horas de ayunas estrictas, autorizándole el acceso al agua hasta dos horas antes de la cirugía. Veinte minutos antes de la inducción es premedicado con 20 mg/kg de ketamina (*Ketolar*, Parker Davis) intramuscular y atropina 0,04 mg/kg intramuscular. Posteriormente, se canaliza una vena en la oreja (*abbocath* número 22) y se monitoriza al animal con electrocardiograma continuo y pulsioximetría. La inducción anestésica se realiza con 2,5 µg/kg de fentanilo (*Fentanest*, Kern Pharma) intravenoso, 2 mg/kg de propofol (*Diprivan*, AstraZeneca Farmacéutica, Madrid, España) intravenoso y 0,6 mg/kg de atracurio (*Tracrium*, GlaxoSmithKline). Se procede a la intubación con el tubo número 6,5. Se conecta a ventilación mecánica controlada al respirador, administrando una fracción inspirada de oxígeno de 60% y 8-10 ml/kg de volumen corriente para mantener normocapnia (*end tidal* de CO₂ entre 35- 40 mmHg).



Foto 1. Animal anestesiado y monitorizado, antes de comenzar la cirugía.

El mantenimiento anestésico se realiza con fentanilo a dosis de $2,5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$, propofol a $10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{h}$ y atracurio a $0,3 \text{ mg}/\text{kg}/30 \text{ min}$. Como sueroterapia de mantenimiento se administra Ringer Lactato a $8 \text{ ml}/\text{kg}/\text{h}$. Se canalizan la arteria femoral derecha y la vena femoral derecha, y se conecta el monitor de PiCCO (Edwards, Irving, California, Estados Unidos) para la medición del GC. La técnica de canalización consiste en la disección del paquete vasculonervioso inguinal, individualizando la arteria y vena femorales. Una vez disecados, se controlan ambos vasos con ligaduras. Posteriormente se canulan con sendos introductores, mediante la técnica de Seldinger.

B) Protocolo quirúrgico

Antes de iniciar ningún procedimiento invasivo, se lava la piel de los animales de experimentación con una solución de povidona yodada para conseguir la asepsia

necesaria. A continuación, se coloca al animal en decúbito lateral derecho. Se realiza una toracotomía izquierda a través del cuarto espacio intercostal, con costectomía inferior. Se lleva a cabo la neumonectomía izquierda disecando previamente la vena ácigos, que impide la visualización del hilio pulmonar. Se continúa con la disección de la vena pulmonar craneal y la arteria pulmonar principal izquierda, hasta su origen en la bifurcación del tronco de la arteria pulmonar. Seguidamente se secciona el ligamento pulmonar y se disecan el bronquio principal izquierdo y la vena pulmonar caudal. A continuación se secciona el bronquio principal izquierdo. Hasta este momento se ventilan ambos pulmones. El tubo de endotraqueal del número 6,5 se ensambla entonces con un tubo del número 9, tal y como se ha indicado anteriormente, ya que los tubos endotraqueales disponibles no tienen longitud suficiente para bloquear el pulmón izquierdo desde la boca.

A continuación, y bajo visión directa fibrobroncoscópica, se avanza hasta el bronquio intermediario derecho, bloqueando el pulmón izquierdo y el bronquio lobar superior derecho (que en estos animales se origina en la tráquea, en posición inmediatamente superior a la carina) y comenzando así la ventilación unipulmonar. Se inician en este momento estrategias de protección pulmonar y se disminuye el volumen tidal a 6 ml/kg. Una vez seccionado el bronquio izquierdo se ocluyen con pinzas la arteria pulmonar y la vena pulmonar caudal y se liga la vena pulmonar craneal. La arteria pulmonar izquierda se ocluye con una pinza protegida cerca de la bifurcación de la arteria pulmonar principal y se secciona distalmente dejando un margen de 5 a 10 mm para poder realizar la anastomosis arterial en el reimplante. La vena pulmonar craneal es ligada cerca de la aurícula y seccionada. Para completar la neumonectomía, la vena pulmonar del lóbulo caudal se pinza cerca de la desembocadura de la vena del lóbulo mediastínico, se

secciona a uno o dos milímetros de la pinza y se sutura con punto continuo de polipropileno 6/0 (*Prolene*, Ethicon, INC, Somerville, New Jersey, Estados Unidos). Para prevenir la trombosis de la arteria pulmonar que se mantiene pinzada durante la cirugía de banco y el reimplante, se realiza heparinización sistémica, 300 UI/Kg (Mayne Pharma España) en bolo en el momento de su oclusión.



Foto 2. Pulmón extraído del animal donante.

A continuación se procede a la cirugía de banco, realizando una lobectomía craneal. Se perfunde el injerto a través de arterias pulmonares (anterógradamente) y a través de las venas (retrógradamente) con un litro de solución de la Universidad de Wisconsin a 10-15 °C, mientras que a la vez se ventila el injerto con un ambú (con fracción inspirada de oxígeno del 21%). Se lleva a cabo la lobectomía craneal *ex - situ*. El pedículo del lóbulo caudal que va a ser reimplantado lo constituyen la arteria pulmonar izquierda tras ligadura y sección de las ramas craneales, la vena pulmonar caudal liberada de

adherencias pleurales hasta las ramas segmentarias y el bronquio principal izquierdo tras sección y sutura del bronquio craneal.

Finalmente el lóbulo caudal es reimplantado mediante anastomosis bronquial con sutura continua de polipropileno 4/0, sutura arterial continua con polipropileno 5/0 y sutura veno - auricular continua con polipropileno 6/0. El tubo se retira hacia la tráquea permitiendo la ventilación del implante y su reperfusión se realiza primero de forma retrograda, despinzando la aurícula izquierda, y después anterógrada, despinzando la arteria pulmonar. La perfusión del lóbulo reimplantado se mantiene durante 60 minutos, tras los cuales se procede a la eutanasia del animal con profundización anestésica e inducción de cardioplejia con cloruro potásico.

C) Diseño experimental

I) Grupos:

Los 18 especímenes se dividieron en tres grupos con las siguientes características:

- **Grupo control (n= 6):** Se realizó el protocolo anteriormente descrito.
- **Grupo de tratamiento con lidocaína (n= 6):** Se realizó el protocolo anteriormente descrito y además se administró un bolo de lidocaína 1,5 mg/kg/iv tras la inducción. Durante el resto del procedimiento se administró una solución de lidocaína a 1,5 mg/kg/h.
- **Grupo sham (n= 6):** El grupo se anestesió del mismo modo que los otros dos. Se realizó toracotomía y se mantuvo exclusivamente en ventilación bipulmonar. Se

tomaron las mismas muestras sanguíneas y tisulares y se realizaron los mismos estudios hemodinámicos que en los otros dos grupos.

II) Momentos de medición y toma de muestras:

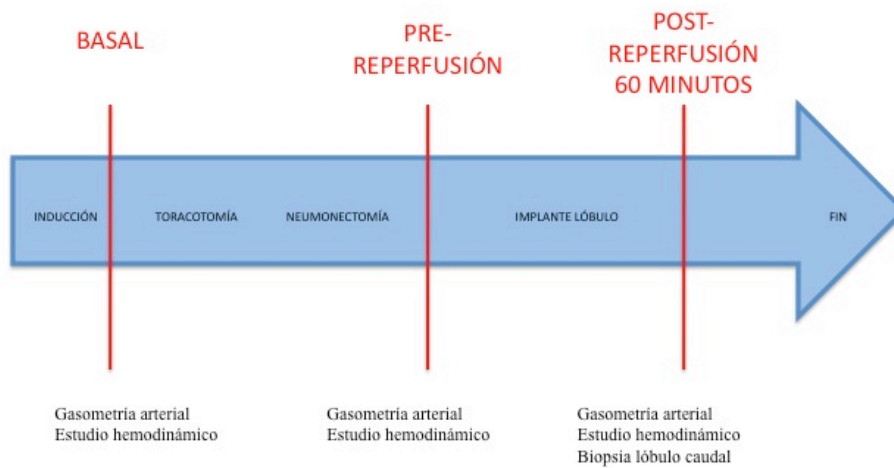


Figura 4. Representación esquemática de los momentos de medición y toma de muestras.

- **Basal (BAS):** 30 minutos después de la inducción anestésica, justo antes de la toracotomía y con el animal ya estabilizado hemodinámicamente y en ventilación bipulmonar. Se extraen muestras de sangre arterial (gasometría arterial) y se realiza un estudio hemodinámico.

- **Pre - reperfusión (PRER):** Antes de reperfundir y ventilar el lóbulo caudal izquierdo, que ya ha sido reimplantado. Se extraen muestras de sangre arterial (gasometría arterial) y se realiza un estudio hemodinámico.

- **Post - reperfusión 60 minutos (POSR60):** A los 60 minutos de la reperfusión del lóbulo caudal izquierdo. Se extraen muestras de sangre arterial (gasometría arterial) y se realiza un estudio hemodinámico. Se extraen, además, muestras histológicas mediante biopsia pulmonar del lóbulo implantado, la cual es inmediatamente conservada en formol.

III) Variables hemodinámicas

Mediante el sistema PiCCO obtuvimos múltiples datos hemodinámicos. La técnica de **termodilución transpulmonar** permite la evaluación de varios parámetros hemodinámicos y respiratorios de forma puntual, a través del análisis de los cambios de temperatura de un determinado volumen conocido de suero frío inyectado en el torrente sanguíneo. Se inicia con un bolo de suero salino isotónico frío ($< 8^{\circ}\text{C}$) a través del sensor de temperatura e inyección situado en la vía venosa central. El líquido inyectado se dispersa rápidamente en los sistemas cardíaco y pulmonar, y al cabo de unos segundos, el termistor específico del catéter arterial mide la variación de temperatura que se ha producido y genera una curva de disipación. El análisis de dicha curva, aplicando la ecuación de Stewart-Hamilton, permite calcular el GC y otras constantes. El **contorno de la onda de pulso** depende del GC y de las características del árbol arterial. El *gasto cardíaco continuo según la onda de pulso* también puede ser calculado. Los parámetros medidos pueden expresarse como valores absolutos o como

valores indexados (calculados según la superficie corporal y basados en los datos antropométricos introducidos al iniciar el análisis).

En el análisis estadístico utilizamos los siguientes parámetros hemodinámicos: presión arterial media (PAM), frecuencia cardiaca (FC), variación de volumen sistólico (VVS) y GC. Se obtuvieron en el momento basal (BAS), pre-reperusión (PRER) y a los 60 minutos post-reperusión (POSR60).

IV) Variables gasométricas

Todas las muestras de sangre arterial procedían de la arteria femoral. Se obtuvieron valores de presión parcial arterial de oxígeno (PaO_2), de presión parcial arterial de dióxido de carbono (PaCO_2) y de pH sanguíneo arterial.

V) Valoración histológica

El procesamiento de las muestras histológicas, las técnicas de tinción convencional e inmunohistoquímicas, el estudio mediante microscopía óptica de las preparaciones histológicas, la adquisición de imágenes mediante fotografía digital de campos microscópicos y el procesamiento de las mismas mediante programas informáticos se realizó en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Gregorio Marañón de Madrid y en el Laboratorio de Neurobiología de la Audición del Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Las muestras para el análisis histológico del tejido pulmonar se obtuvieron a los 60 minutos de la reperfusión del lóbulo caudal izquierdo, es decir, del reimplantado. Las muestras fueron fijadas en una solución de formaldehído tamponado al 10% durante 24 horas. Después se incluyeron en bloques de parafina.

V.1 Tinción hematoxilina-eosina

a) Descripción de la técnica

Esta tinción es el método de rutina más utilizado en histología, pues permite distinguir detalles morfológicos de células y tejidos. Las características de sus compuestos hacen posible la visualización al microscopio óptico de las células y sus núcleos, que se tiñen de forma diferenciada.

A partir de los bloques de parafina se obtuvieron secciones de 4 μm con microtomo. A continuación se montaron en portas bañados en xilano, incubándose durante 12 horas a 60° C. Se desparafinaron con xileno y se rehidrataron utilizando alcoholes de graduación sucesiva durante 5 minutos, tras lo cual fueron lavadas con agua destilada otros 5 minutos.

Posteriormente fueron teñidas con hematoxilina-eosina mediante el método de Harris, según se detalla a continuación:

Los portas se colocan en cestillos que se introducen durante 8 o 15 minutos en la solución de Harris. A continuación, se lava el exceso de hematoxilina con agua y se diferencian con una mezcla de ácido hidrociorhídrico al 1% y etanol 70% durante 8

segundos. Se aclaran y se azulean durante 60 segundos en una solución de amoníaco débil o en una solución de carbonato de litio. Se lava de nuevo con agua 10 minutos. Posteriormente, se introducen las preparaciones durante un período entre 15 segundos y 3 minutos en la solución de eosina. Se deshidratan en etanol al 95%, primero, y de 100%, después. Finalmente se introducen en xileno y se montan.

b) Examen de las muestras y cuantificación

En la literatura, los principales cambios histológicos descritos mediante microscopía óptica en biopsias de tejido pulmonar tras trasplante o SIR son destrucción de la arquitectura alveolar, edema intersticial, exudación de eritrocitos al espacio alveolar, aparición de membranas hialinas a lo largo de los ductos alveolares, infiltrado leucocitario en vasos e intersticio pulmonar y desunión entre células endoteliales y entre neumocitos (9, 86). En base a estas observaciones, en cada muestra se consideraron los siguientes parámetros:

1- Presencia o ausencia de infiltrado inflamatorio: la ausencia total de infiltrado inflamatorio se clasificó como 0. En caso de inflamación, se describió la presencia o ausencia de distintos tipos de células inflamatorias (monocito-macrófagos, neutrófilos o linfocitos) y se evaluó cuasi-cuantitativamente la cantidad de células encontradas, mediante una escala del 0 (ninguna célula) al 3 (presencia abundante). Se excluyen los campos con denso componente inflamatorio de probable etiología infecciosa.

2- Presencia o ausencia de edema, considerando como tal el engrosamiento de los septos alveolares o interlobares. Se utilizó una escala cuasi-cuantitativa del 0 (ausencia de edema) al 3 (edema abundante).

3- Congestión pulmonar, considerando como tal la presencia de capilares alveolares o vasos de pequeño calibre dilatados y rellenos de hematíes. Se utilizó una escala cuasi-cuantitativa del 0 (ausencia de congestión) al 3 (congestión abundante).

V.2 Tinción inmunohistoquímica

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la identificación y localización de compuestos o radicales químicos en células y tejidos mediante la utilización de anticuerpos (Ac). Están basadas en la capacidad que tienen estos para reconocer a moléculas y unirse a ellas. La combinación de los Ac con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en el tejido, y comparar resultados de muestras procesadas con diferentes tinciones o Ac. Es un método selectivo y más resolutivo que la histología convencional, con alto grado de sensibilidad y especificidad, cuya ejecución es relativamente sencilla.

El objetivo de la técnica inmunohistoquímica es detectar, amplificar y hacer visible un antígeno (Ag) determinado. Para la detección específica se emplean Ac dirigidos contra el Ag celular buscado; son los denominados *Ac primarios* (Ac-I). Para amplificar esta unión y detectarla se emplean otros Ac, dirigidos esta vez contra el Ac primario y llamados *Ac secundarios* (Ac-II). Finalmente, para visualizar el conjunto se emplea una combinación de avidina y biotina que permite, mediante una simple reacción química

local, colorear y hacer visible al microscopio la cadena de Ac (Figura 5). Es preciso inhibir la peroxidasa endógena antes de proceder a la tinción.

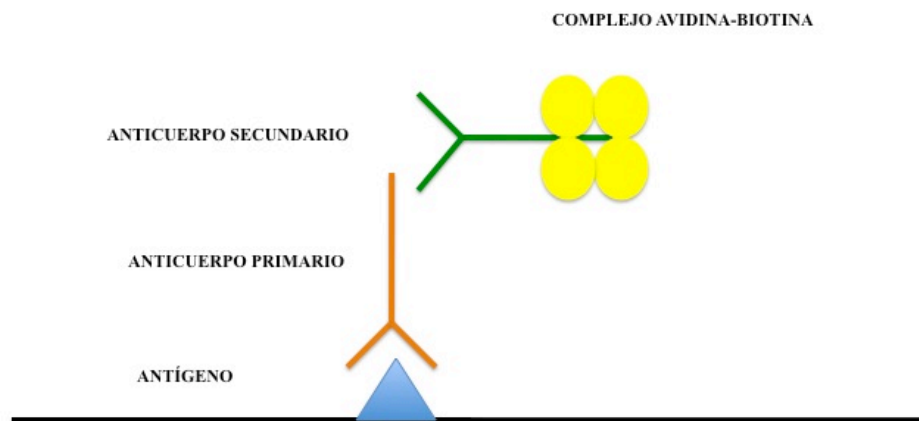


Figura 5. Representación esquemática de la técnica de inmunohistoquímica.

a) Descripción de la técnica

Tras la postfijación de las muestras de tejido pulmonar (paraformaldehído al 4% en PBS 0,1M y pH 7,4), éstas se incluyeron en bloques de parafina para su seccionado en cortes de 4 μm de grosor (con microtomo Leica RM 2135). Los cortes obtenidos fueron distribuidos de manera seriada en portaobjetos de vidrio, y un corte de cada muestra, al azar, se tiñó con una tinción simple de hematoxilina-eosina para determinar la calidad del tejido.

El estudio de la existencia de los diferentes Ag presentes en las muestras se realizó mediante detección inmunohistoquímica de visualización indirecta con Ac secundario biotinilado. Los Ac primarios específicos elegidos para el presente estudio fueron:

- Anti-Bcl-2 (1:100, Novus Biologicals, 8C8, monoclonal, hecho en ratón).
- Anti-Caspasa 9 (1:100, Biorbyt, orb1677, policlonal, hecho en conejo).
- Anti-CD68 (1:100, MyBioSource, MBS370038, monoclonal, hecho en ratón).
- Anti-MCP1 (1:100, MyBioSource, MBS2027425, policlonal, hecho en conejo).

Tras la hidratación de los cortes de parafina, se realizó una inhibición de las peroxidasas endógenas del tejido mediante la incubación de las muestras durante unos minutos con peróxido de hidrógeno. Posteriormente se incubaron con el suero del animal del que se había extraído el Ac-II, para evitar su unión inespecífica en el tejido, junto con un detergente (Tritón-X100, Sigma-Aldrich), encargado de permeabilizar la membrana plasmática y permitir el acceso de los productos al interior de la célula.

La detección del Ag deseado se realizó mediante la incubación de la muestra con el Ac-I específico (24h, 4°C y oscuridad). A continuación las muestras se lavaron con PBS (0.1M, pH 7.4) y se incubaron con el Ac-II biotinilado (1:200, 1h, temperatura ambiente y oscuridad). El objetivo de estas maniobras es que el Ac-II se una específicamente al Ac-I para amplificar la reacción Ag-Ac-I. Los Ac-II están biotinilados para permitir la unión de estos con el complejo avidina-biotina. Este complejo contiene una peroxidasa, que cataliza la liberación de oxígeno a partir de peróxido de hidrógeno, lo que afectará a un sustrato oxidable, la diaminobencidina, incluida en la última solución de incubación del proceso. La diaminobencidina oxidada es insoluble en agua y precipita sobre el

complejo antígeno-anticuerpo. Así, el precipitado resultante de este proceso, de color marrón-rojizo, evidencia la reacción antígeno-anticuerpo en el tejido y por tanto hace patente la localización del Ag en la célula.

Para la interpretación de los resultados de las tinciones inmunohistoquímicas de los Ac CD68, MCP1, caspasa 9 y Bcl-2 se realiza un estudio descriptivo y un análisis de variables, tal y como se detalla a continuación.

b) Estudio descriptivo de las tinciones inmunohistoquímicas

Para cada anticuerpo del estudio se describe la expresión de cada técnica en función del tipo de célula que resulta positiva, la localización (citoplasmática, nuclear o mixta) y la intensidad de la tinción.

c) Análisis cuasi-cuantitativo:

1) Caspasa 9

De cada muestra de pulmón (correspondiente a un experimento), se fotografían diez campos, de 40 aumentos ($0,035 \text{ mm}^2$) cada uno, de predominio alveolar, evitando zonas de desestructuración o hemorrágicas.

En cada campo seleccionado dos observadores, independientes y desconocedores del origen de la muestra, con ayuda del programa informático ImageJ (versión 1.51j8), asignaron a cada campo seleccionado un porcentaje de células neumocitarias teñido respecto al conjunto de neumocitos que se distinguen en todas las paredes alveolares del

campo. Este porcentaje se transforma en una variable cuasi-cuantitativa del 0 al 2, correspondiendo el valor 0 a ausencia de tinción, el valor 1 a tinción en menos del 50% de las células y el valor 2 a tinción en más del 50% de las células. En caso de discrepancia, los dos observadores revisaron la muestra para alcanzar un acuerdo. Posteriormente se le asignó a cada muestra pulmonar el valor de la mediana de los valores de los diez campos observados. Se considera tinción celular positiva a cualquier grado de tinción (rojo-parda), difusa o granular, citoplasmática o nuclear, en células claramente diferenciables.

2) CD68, MCP-1 y Bcl-2

De cada muestra de pulmón (correspondiente a un experimento), se fotografiaron diez campos, de 40 aumentos ($0,035 \text{ mm}^2$) cada uno, de predominio alveolar, evitando zonas desestructuradas o hemorrágicas.

Las secciones fueron estudiadas utilizando un fotomicroscopio Leica Leitz DMRB, una cámara Nikon DS-Fi1 y el programa Nis-elements F de captura de imágenes. Dos observadores, independientes y desconocedores del origen de la muestra, contaron, con ayuda del programa informático ImageJ 1.51j8, el número de células teñidas en cada campo y se le asigna a cada muestra pulmonar el valor de la media de los valores de los diez campos observados. Sólo se cuentan aquellas células claramente individualizables y con tinción claramente positiva, citoplasmática o nuclear.



Foto 3. Fotomicroscopio Leica Leitz DMRB y cámara Nikon DS-Fi1 utilizados para evaluar las secciones de inmunohistoquímica.

VI) Análisis de los datos y tratamiento estadístico

Con todos los datos clínicos y de laboratorio registrados se confecciona una base de datos con el programa IBM_SPSS_Statistics_24 para Mac.

Las variables cualitativas y cuasi-cuantitativas (*grado de inflamación, tipo de célula inflamatoria, grado de edema y grado de congestión*) se expresan con la frecuencia (porcentaje). Las cuantitativas se presentan como media (error típico) cuando siguen una distribución normal.

En los que respecta al análisis de las variables cuasi-cuantitativas, éstas son tratadas como variables cualitativas, empleando el test de Chi-cuadrado para detectar diferencias entre los grupos de estudio. Los resultados son expresados en una tabla de contingencia.

Para identificar las diferencias significativas entre los grupos en las variables cuantitativas se utiliza el test de Kruskal-Wallis. Posteriormente, para analizar los pares de muestras específicos y encontrar diferencias significativas se usa el Test de Mann-Whitney. La significación estadística es establecida con $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 VARIABLES GENERALES

En el análisis de las variables generales no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control (CON), tratado con lidocaína (LIDO) y grupo de cirugía simulada (SHAM) respecto al peso de los animales o duración del procedimiento quirúrgico. Tampoco se hallaron diferencias significativas entre los grupos CON y LIDO en relación al tiempo de isquemia pulmonar (tabla 1).

Tabla 1. Variables demográficas y tiempos quirúrgicos

VARIABLE	GRUPO	VALOR	P
Peso (kilos)	CON	34 (1)	> 0,05
	LIDO	39 (2)	
	SHAM	37 (1)	
Tiempo de isquemia (minutos)	CON	123 (3)	> 0,05
	LIDO	125 (4)	
Tiempo total de intervención (minutos)	CON	249 (4)	> 0,05
	LIDO	255 (9)	
	SHAM	222 (8)	

Los resultados se expresan como media (error típico). CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulada. La comparación de estos valores entre grupos mostró una $p > 0,05$.

5.2 VARIABLES HEMODINÁMICAS

En el análisis estadístico de los valores de PAM, FC y VVS, medidos por sistema PiCCO, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (tabla 2). Los parámetros hemodinámicos se mantuvieron dentro de los límites fisiológicos.

Tabla 2. Variables hemodinámicas.

VARIABLE	GRUPO	BAS	PRER	POSR60
PAM (mmHg)	CON	91 (7)	91 (4)	76 (5)
	LIDO	92 (6)	82 (8)	72 (7)
	SHAM	103 (9)	108 (6)	103 (8)
FC (latidos/min)	CON	87 (5)	104 (4)	97 (7)
	LIDO	87 (6)	88 (4)	87 (5)
	SHAM	103 (8)	90 (8)	100 (4)
VVS (%)	CON	12 (1)	11 (1)	9 (1)
	LIDO	17 (2)	7 (1)	9 (2)
	SHAM	15 (1)	9 (1)	8 (1)

Los resultados se expresan como media (error típico). BAS: basal. PRER: pre-reperusión. POSR60: post-reperusión 60 minutos. CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulado. PAM: presión arterial media. FC: frecuencia cardíaca. VVS: variación de volumen sistólico. La comparación de estos valores entre grupos mostró una $p > 0,05$.

5.3 VARIABLES GASOMÉTRICAS

Se determinaron los valores de pO₂, pCO₂ y pH en la arteria femoral. Los parámetros se mantuvieron dentro de los límites fisiológicos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (tabla 3).

Tabla 3. Variables respiratorias obtenidas en arteria femoral.

VARIABLE	GRUPO	BAS	PRER	POSR60
pO ₂	CON	287 (26)	205 (18)	274 (65)
	LIDO	361 (47)	222 (28)	304 (22)
	SHAM	313 (13)	264 (16)	330 (10)
pCO ₂	CON	44 (5)	37 (1)	43 (3)
	LIDO	38 (2)	39 (2)	37 (2)
	SHAM	41 (2)	44 (3)	47 (4)
pH	CON	7,4 (0,04)	7,5 (0,02)	7,4 (0,03)
	LIDO	7,5 (0,03)	7,5 (0,02)	7,5 (0,03)
	SHAM	7,5 (0,01)	7,4 (0,02)	7,4 (0,02)

Los resultados se expresan como media (error típico). BAS: basal. PRER: pre-reperusión. POSR60: post-reperusión 60 minutos. CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulado. La comparación de estos valores entre grupos mostró una $p > 0,05$.

5.4 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

A) TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

I) Estudio descriptivo

Se seleccionan áreas centrales de parénquima pulmonar, de predominio alveolar. Se observa un aumento del componente inflamatorio intravascular habitual y la presencia de un infiltrado inflamatorio intersticial de predominio mononuclear (sistema monocito-macrófago) (fotos 4 y 5). Aunque el grado de edema no alcanzó diferencias significativas entre los grupos, se objetivan algunos septos intersegmentarios ensanchados (foto 6). También se evidencia congestión importante, con capilares alveolares dilatados y rellenos de hematíes (fotos 7 y 8).

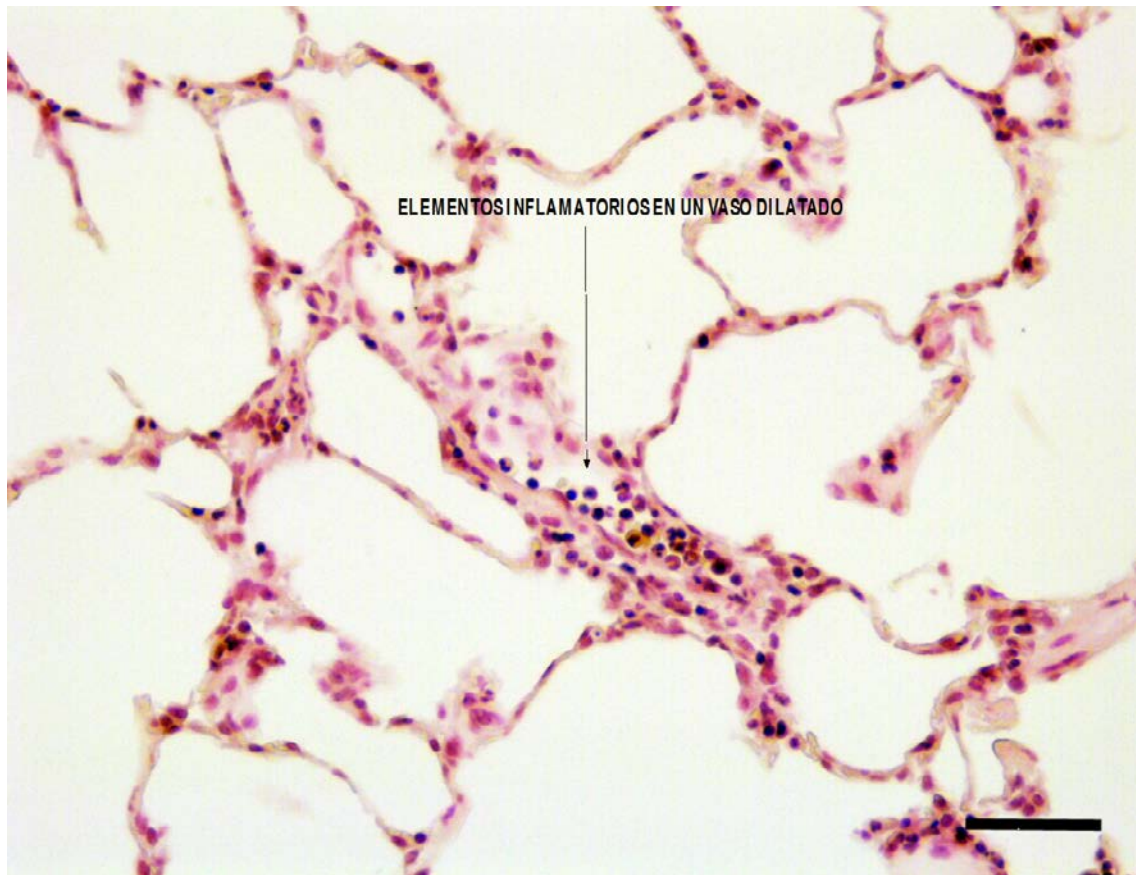


Foto 4. Tinción de hematoxilina-eosina, correspondiente al grupo tratado con lidocaína. Campo de 20 aumentos. Marca de escala correspondiente a 50 μ .

Área de parénquima pulmonar periférico a 20 aumentos, con tabiques alveolares bien conformados, no ensanchados, con presencia de núcleos de neumocitos. Destaca, en el centro de la imagen, un vaso tipo capilar, discretamente dilatado, que contiene elementos inflamatorios entre los que se distinguen ocasionales linfocitos y polimorfonucleares.

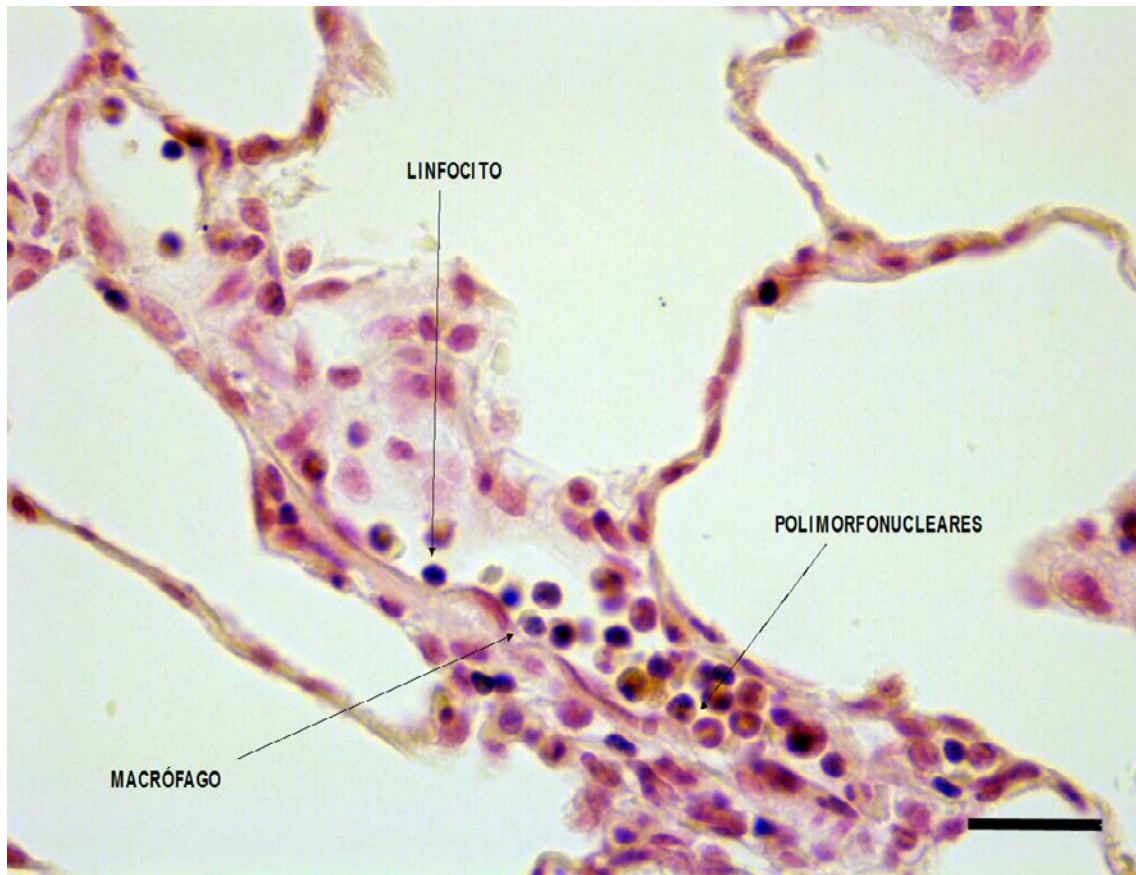


Foto 5. Tinción de hematoxilina-eosina, correspondiente al grupo tratado con lidocaína. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Detalle de la foto anterior. Interior del vaso.

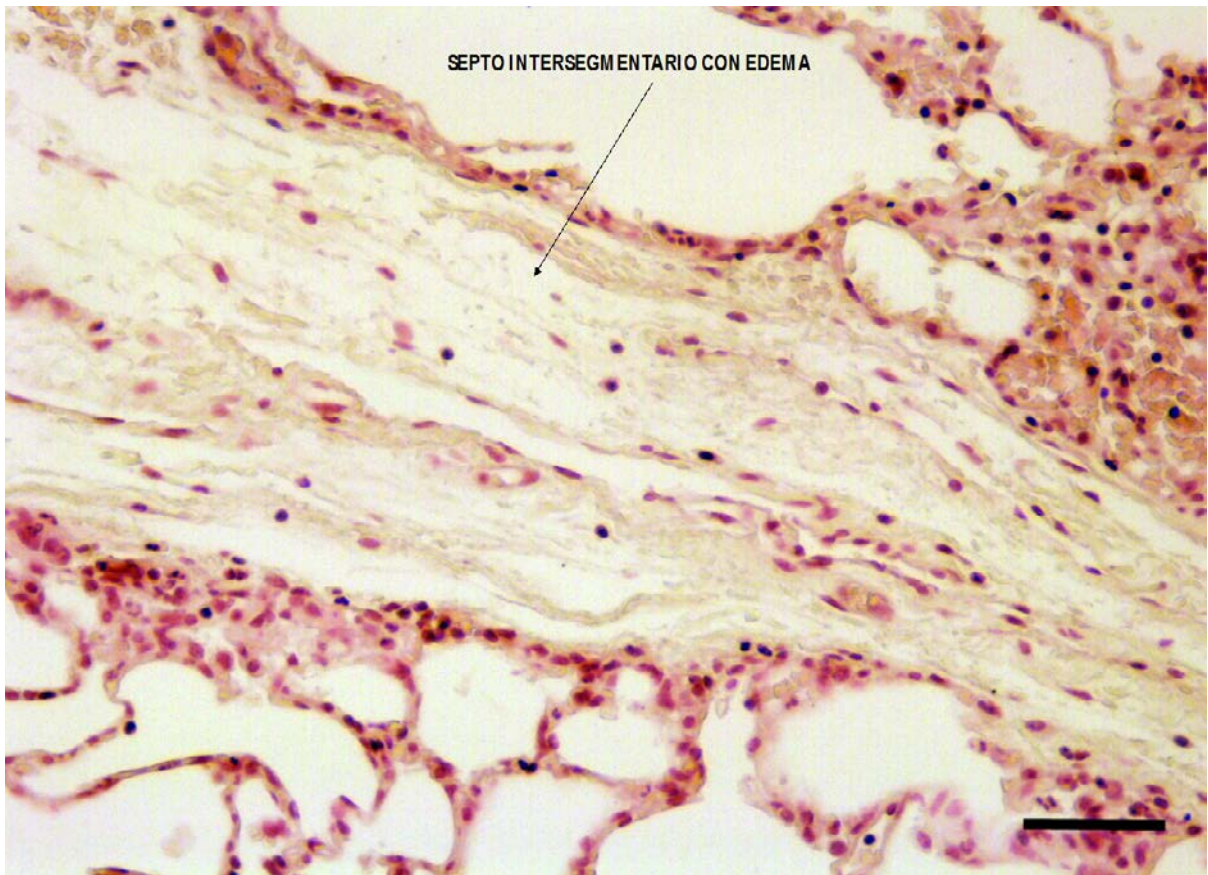


Foto 6. Tinción de hematoxilina-eosina, correspondiente al grupo control. Campo de 20 aumentos. Marca de escala correspondiente a 50 μ .

Septo intersegmentario dilatado con la presencia de edema y núcleos de fibroblastos.

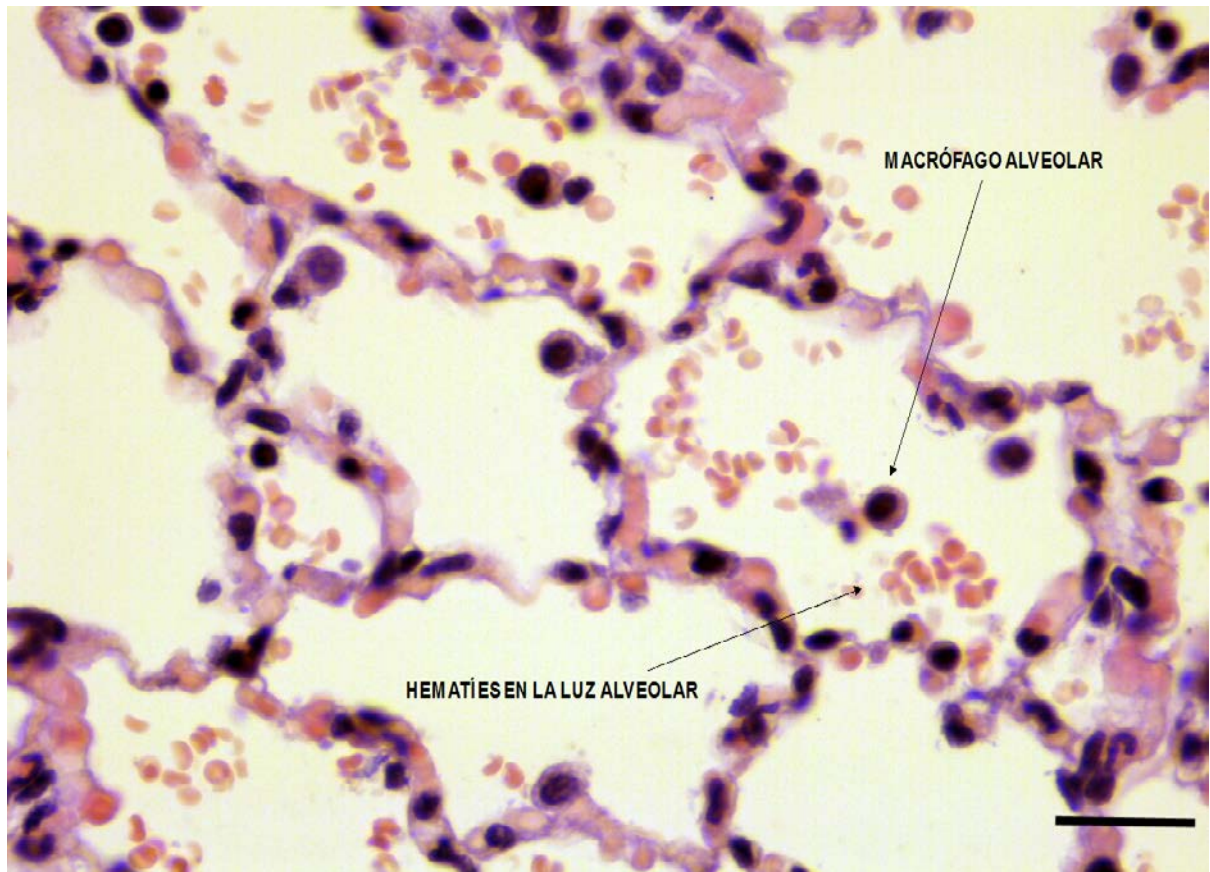


Foto 7. Tinción de hematoxilina-eosina, correspondiente al grupo control. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Campo de parénquima pulmonar periférico en el que se observa marcada congestión de tabiques alveolares, con presencia de capilares dilatados y rellenos de material hemático. En el interior del alveolo se identifica la presencia de hematíes y de numerosos macrófagos intraalveolares.

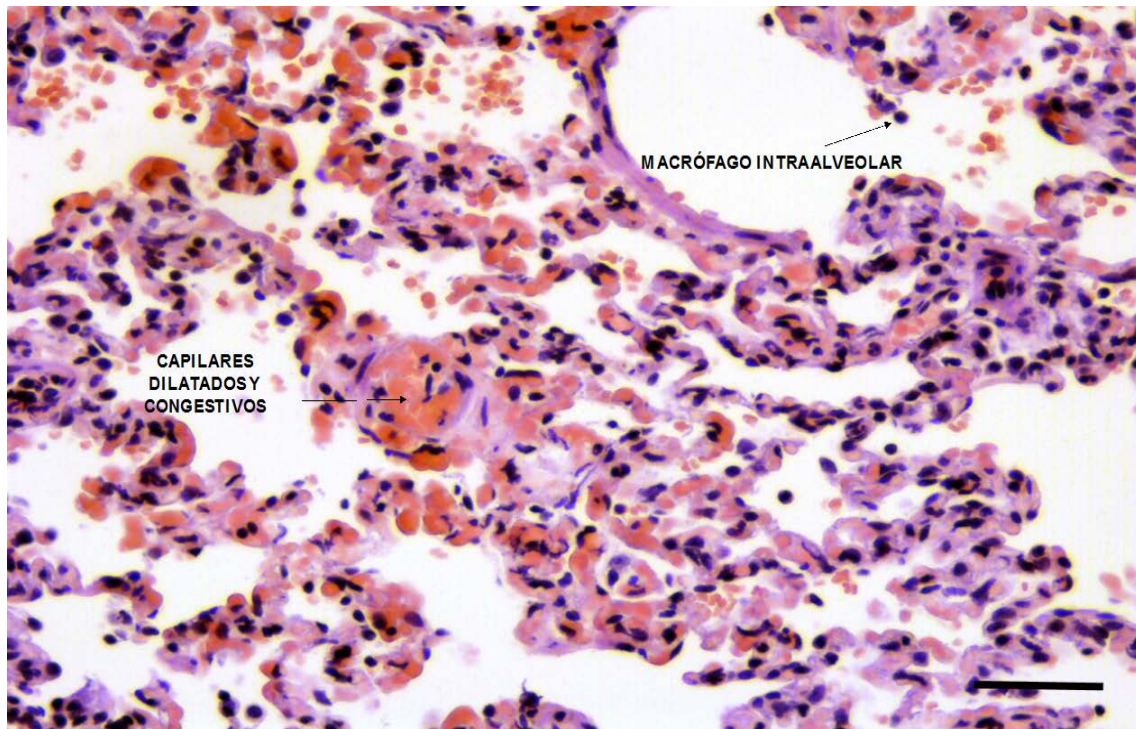


Foto 8. Tinción de hematoxilina-eosina, correspondiente al grupo tratado con lidocaína. Campo de 20 aumentos. Marca de escala correspondiente a 50 μ .

Parénquima pulmonar periférico con tabiques alveolares en los que destaca la presencia de capilares marcadamente dilatados y congestivos, rellenos de material hemático. En algunos campos se observa además la presencia de macrófagos intraalveolares.

II) Estudio cuasi-cuantitativo

En la tabla 4 se presenta la distribución de frecuencias - y sus porcentajes dentro del grupo correspondiente - de los parámetros *grado de inflamación* y *grado de infiltración* por los diferentes tipos de elementos celulares. La isquemia-reperfusión indujo en el tejido pulmonar un aumento del infiltrado inflamatorio a los 60 minutos de reperfusión, significativa con respecto al grupo de cirugía simulada SHAM - no sometido a isquemia-reperfusión - (CON vs SHAM, $p= 0,026$). La infiltración inflamatoria por células de tipo monocito - macrófago, fue más abundantes que en el grupo SHAM (CON vs SHAM, $p = 0,005$). En el grupo que recibió tratamiento con lidocaína intravenosa se observa en el tejido pulmonar, a los 60 minutos post-reperfusión, una menor inflamación que en el grupo control (LIDO vs CON, $p= 0,026$), y una menor infiltración por células del sistema monocito-macrófago con respecto al grupo control (LIDO vs CON, $p= 0,027$). No se han encontrado diferencias significativas entre la infiltración inflamatoria del grupo LIDO y del grupo SHAM. No se observaron diferencias entre los grupos respecto al grado de infiltración por linfocitos o polimorfonucleares.

Tabla 4. Determinación histopatológica del daño pulmonar por isquemia-reperfusión mediante tinción hematoxilina-eosina a los 60 minutos de la perfusión (inflamación y tipos celulares inflamatorios).

GRUPO	Grado	Inflamación		MM		Linfocitos		PMN	
		N	P	N	P	N	P	N	P
CON	Nada	1	16,7%	1	16,7%	2	33,3%	6	100%
	Leve	4	66,7%	5	83,3%	3	50%	0	0%
	Moderado	1	16,7%	0	0%	1	16,7%	0	0%
	Severo	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
LIDO	Nada	5	83,3%	5	83,3%	5	83,3%	6	100%
	Leve	1	16,7%	1	16,7%	1	16,7%	0	0%
	Moderado	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	Severo	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
SHAM	Nada	5	83,3%	6	100%	5	83,3%	6	100%
	Leve	1	16,7%	0	0%	1	16,7%	0	0%
	Moderado	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	Severo	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%

MM: Monocito-macrófagos. N: número de casos en el grupo. P: porcentaje de casos en el grupo. PMN: polimorfonucleares. CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo cirugía simulada. La inflamación fue mayor tras la isquemia – reperfusión (CON vs SHAM, $p=0,026$). La inflamación fue menor en el grupo tratado respecto al no tratado (LIDO vs CON, $p= 0,026$). Hubo mayor infiltración por MM en el grupo no tratado (CON vs SHAM, $p=0,005$; CON vs LIDO, $p= 0,027$).

En la tabla 5 se presenta la distribución de frecuencias - y sus porcentajes dentro del grupo correspondiente - de los parámetros *grado de edema intersticial* y *grado de congestión capilar*. No se encontraron diferencias significativas en el grado de edema de los tejidos pulmonares de los distintos grupos de estudio a los 60 minutos post-reperfusión. La isquemia-reperfusión pulmonar indujo en el tejido pulmonar un aumento de la congestión, que fue mayor en los pulmones no tratados con lidocaína respecto al grupo no sometido a isquemia-reperfusión (CON vs SHAM, $p= 0,005$). No hubo diferencias en el grado de congestión de los pulmones tratados con lidocaína y el grupo SHAM.

Tabla 5. Determinación histopatológica del daño pulmonar por isquemia-reperusión mediante tinción hematoxilina-eosina a los 60 minutos de la reperusión (edema intersticial y congestión capilar).

GRUPO	Grado	Edema		Congestión	
		N	P	N	P
CON	Nada	0	0%	1	16,7%
	Leve	5	83,3%	5	83,3%
	Moderado	1	16,7%	0	0%
	Severo	0	0%	0	0%
LIDO	Nada	3	50%	4	66,7%
	Leve	3	50%	1	16,7%
	Moderado	0	0%	1	16,7%
	Severo	0	0%	0	0%
SHAM	Nada	3	50%	6	100%
	Leve	3	50%	0	0%
	Moderado	0	0%	0	0%
	Severo	0	0%	0	0%

N: número de casos en el grupo. P: porcentaje de casos en el grupo. PMN: polimorfonucleares. CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo cirugía simulada. El grado de congestión fue mayor en el grupo no tratado que en el de cirugía simulada (CON vs SHAM, $p=0,005$).

B) TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

I) Tinción inmunohistoquímica con CD68.

- Estudio descriptivo:

Con el Ac para el Ag CD68 se observa, en parénquima pulmonar periférico con tabiques alveolares morfológicamente normales, tinción de las células de la estirpe monocito-macrófago, tanto en la luz alveolar (fotos 9 y 10), como en el intersticio (foto 11). El citoplasma de estas células aparece teñido de forma granular e intensa. También se puede apreciar un vaso congestivo (foto 11), con abundantes hematíes en su interior,

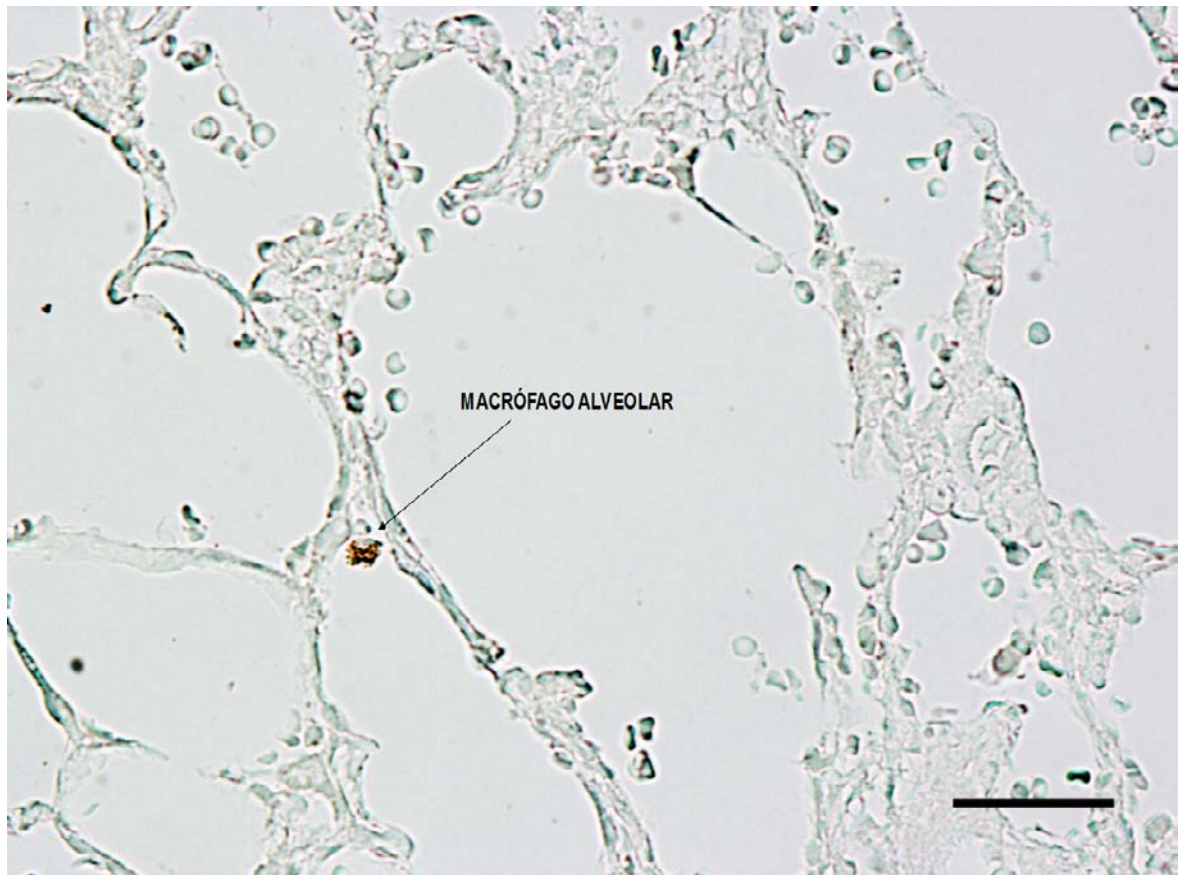


Foto 9. Tinción inmunohistoquímica para CD68, correspondiente al grupo control. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Campo correspondiente a parénquima pulmonar periférico, con tabiques alveolares respetados. En una luz alveolar se distingue una célula de estirpe macrofágica, con tinción citoplasmática fuerte de tipo granular.

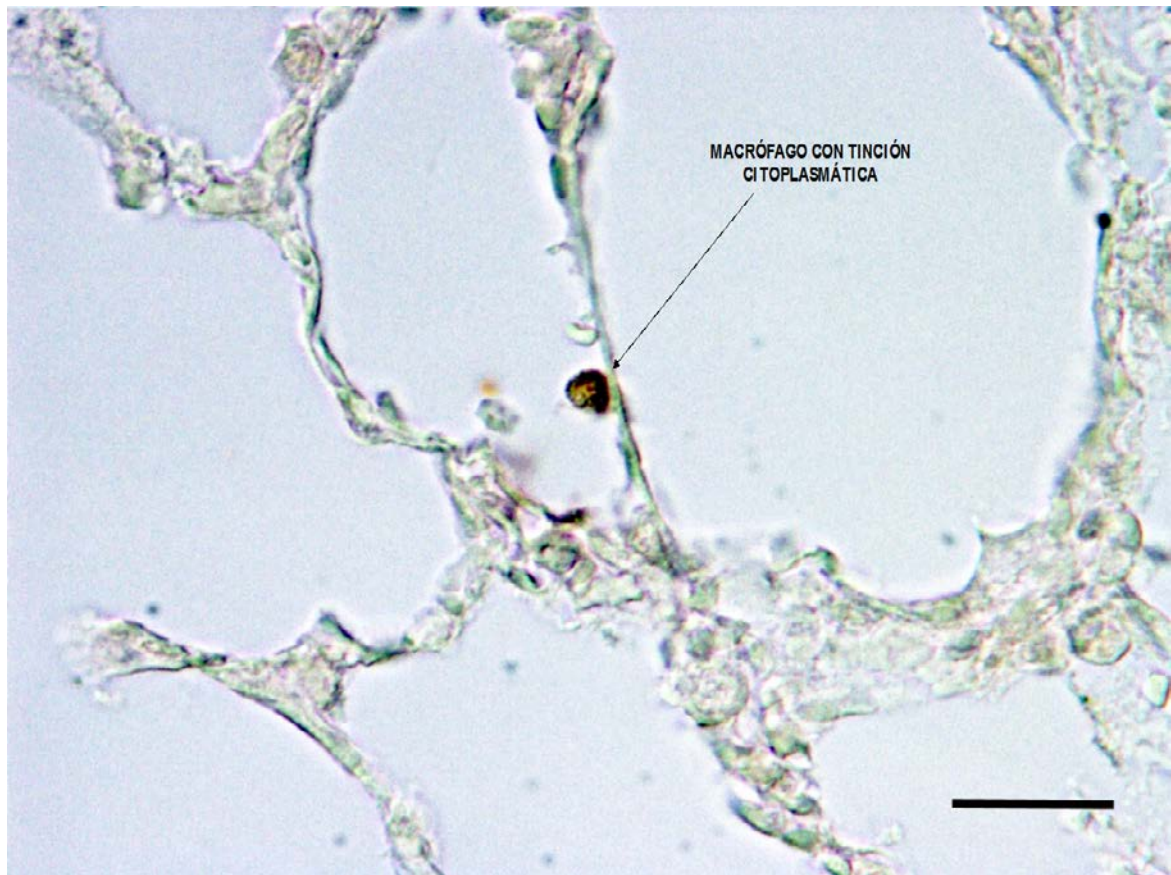


Foto 10. Tinción inmunohistoquímica para CD68, correspondiente al grupo control. Campo de 63 aumentos. Marca de escala correspondiente a 10 μ .

Campo de gran aumento, correspondiente a parénquima pulmonar periférico en el que se distinguen los tabiques alveolares de forma claramente individualizada. En la luz alveolar destaca un macrófago con gránulos intensamente teñidos en localización citoplasmática.

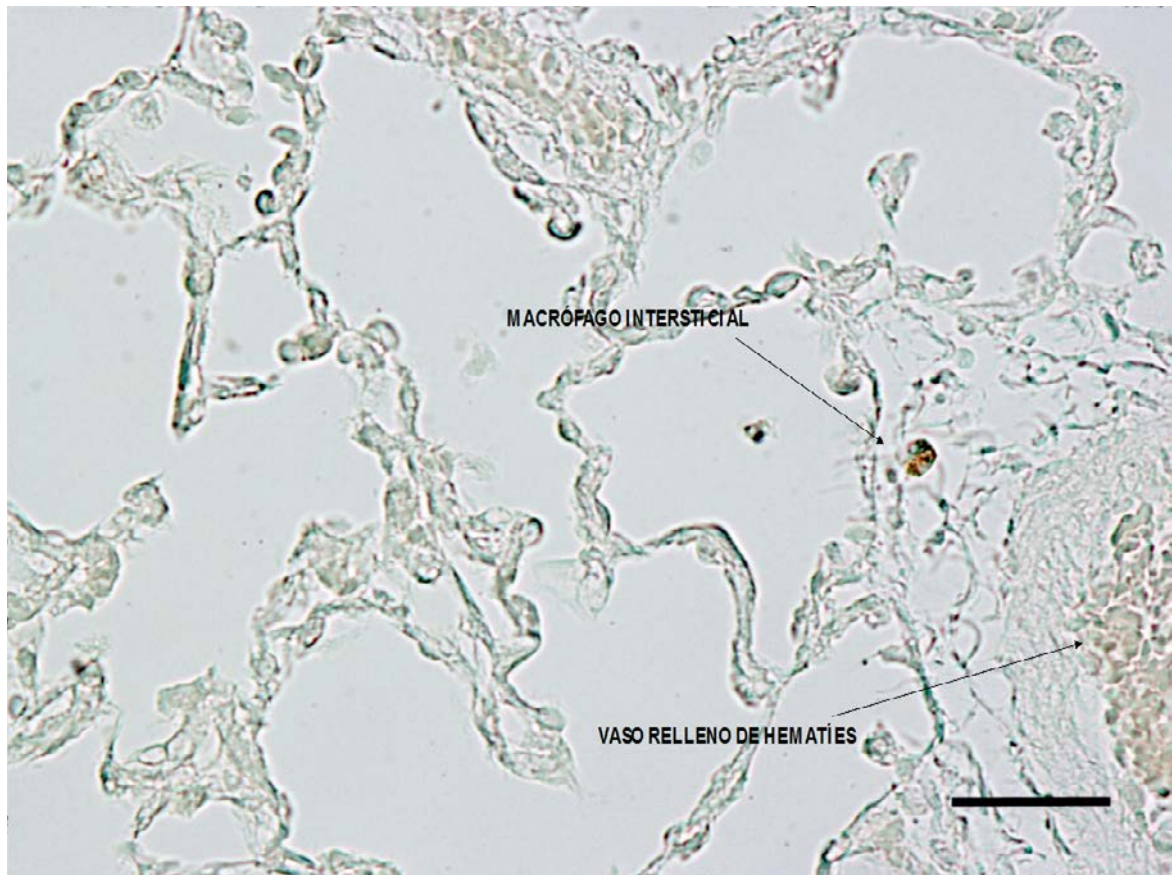


Foto 11. Tinción inmunohistoquímica para CD68, correspondiente al grupo control. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Parénquima pulmonar periférico en el que se identifican tabiques alveolares respetados, En la parte inferior derecha de la imagen se evidencia lo que puede corresponder a un vaso, con abundantes hematíes en su interior. Además se distingue una célula con tinción citoplasmática que podría ser un macrófago intersticial.

- Estudio analítico:

La isquemia-reperfusión indujo en el tejido pulmonar un aumento de la expresión de células con tinción positiva para CD68 en muestras obtenidas de biopsias extraídas a los 60 minutos de la perfusión [6,17 (0,65) vs 0,16 (0,16), CON vs SHAM, $p=0,002$]. En los pulmones del grupo LIDO no se observó el aumento de las células con tinción positiva para CD68 con respecto al grupo CON, que no recibió tratamiento [0,83 (0,31) vs 6,17 (0,65), LIDO vs CON, $p=0,003$]. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos LIDO y SHAM (tabla 6, figura 6).

Tabla 6. Análisis cuantitativo de células con tinción positiva para CD68 en un área de 0,35 mm² de tejido pulmonar a los 60 minutos de la perfusión.

GRUPO	Nº DE CÉLULAS
CON	6,17 (0,65) * √
LIDO	0,83 (0,31)
SHAM	0,16 (0,16)

Los resultados se expresan como media (error típico). CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulado. (* $p=0,002$, CON vs SHAM. √ $p=0,003$, CON vs LIDO).

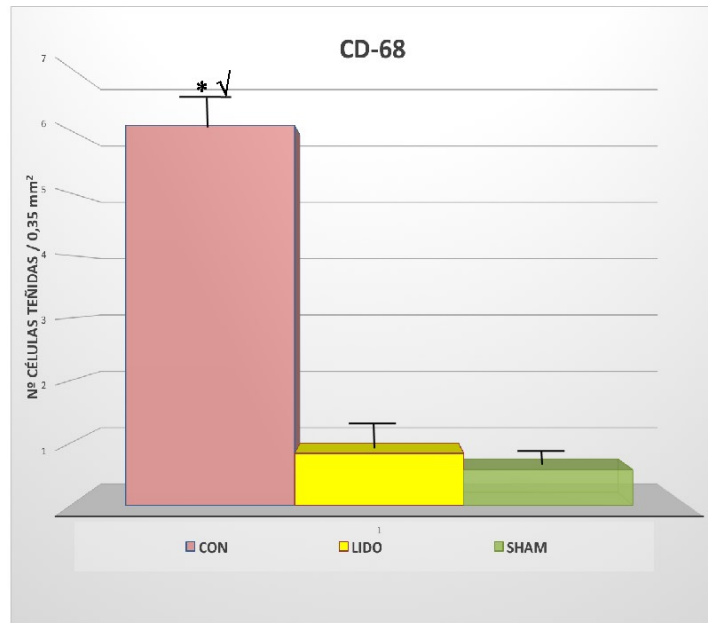


Figura 6. Tinción inmunohistoquímica de CD68 en tejido pulmonar a los 60 minutos de la reperfusión. Los resultados se expresan como media del número de células encontradas en 10 campos de 0,35 mm². CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulada. (* p= 0,002, CON vs SHAM. ✓ p= 0,003, CON vs LIDO).

II) Tinción inmunohistoquímica con MCP-1.

- Estudio descriptivo:

Con la tinción inmunohistoquímica para MCP-1, en campo pulmonar periférico con luces alveolares conservadas, permite identificar células de estirpe neumocitaria – con tinción nuclear (fotos 13 y 14) – y macrófagos alveolares – con tinción citoplasmática (foto 12).

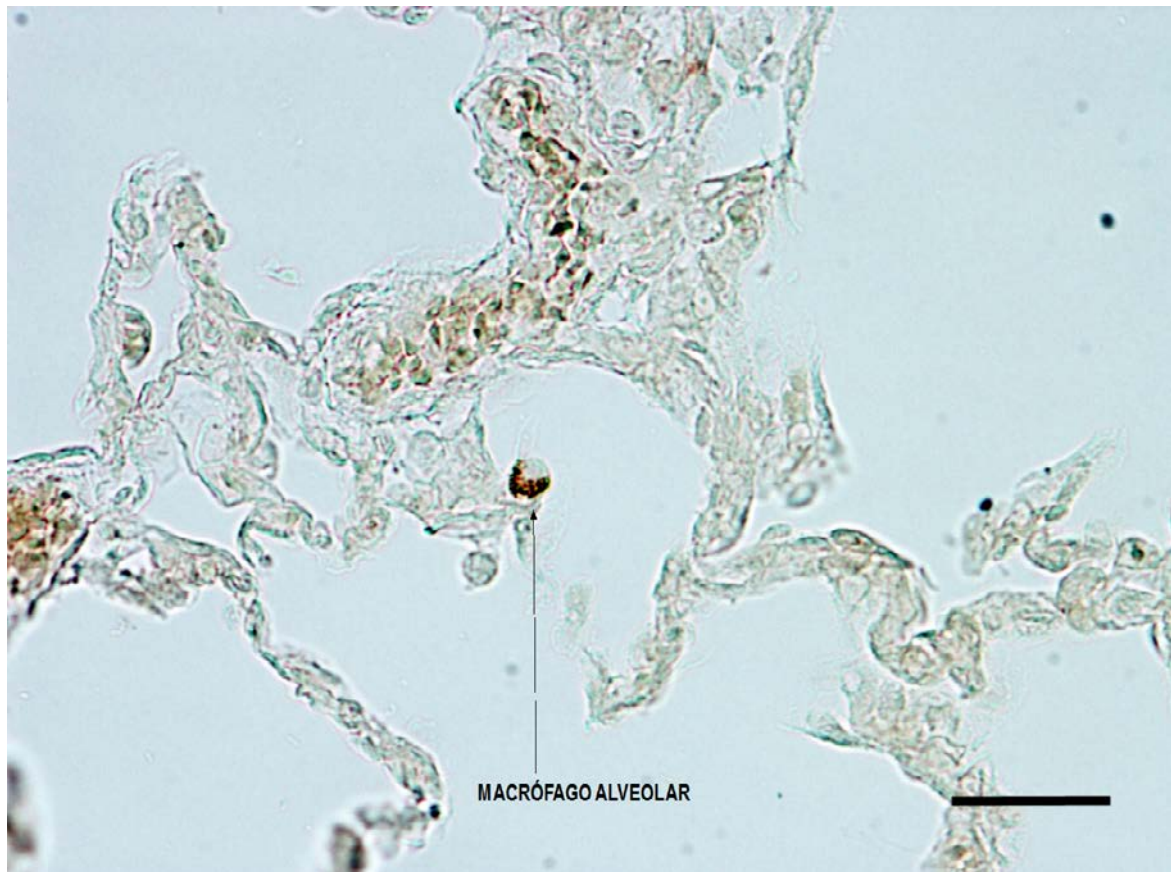


Foto 12. Tinción inmunohistoquímica para MCP-1, correspondiente al grupo control. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

En esta imagen se observa parénquima pulmonar periférico con tabiques y luces alveolares en las que se evidencia una célula que, por localización y morfología, podría corresponder a un macrófago. Posee tinción citoplasmática fuerte y granular.

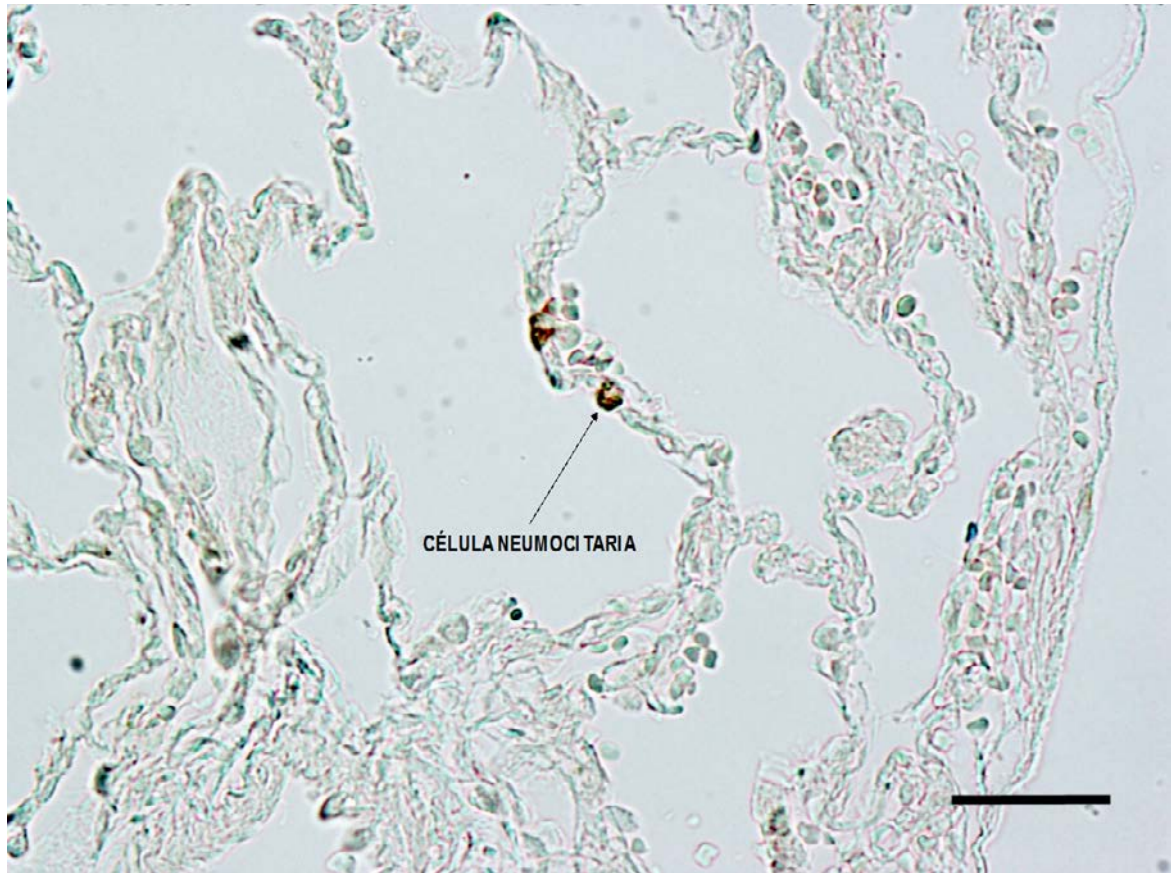


Foto 13. Tinción inmunohistoquímica para MCP-1, correspondiente al grupo control. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Parénquima pulmonar periférico con tabiques alveolares y la presencia evidente de dos células teñidas, una de las cuales presenta tinción granular fuerte en localización nuclear, y que, por localización y morfología podría corresponder a una célula de estirpe neumocitaria,

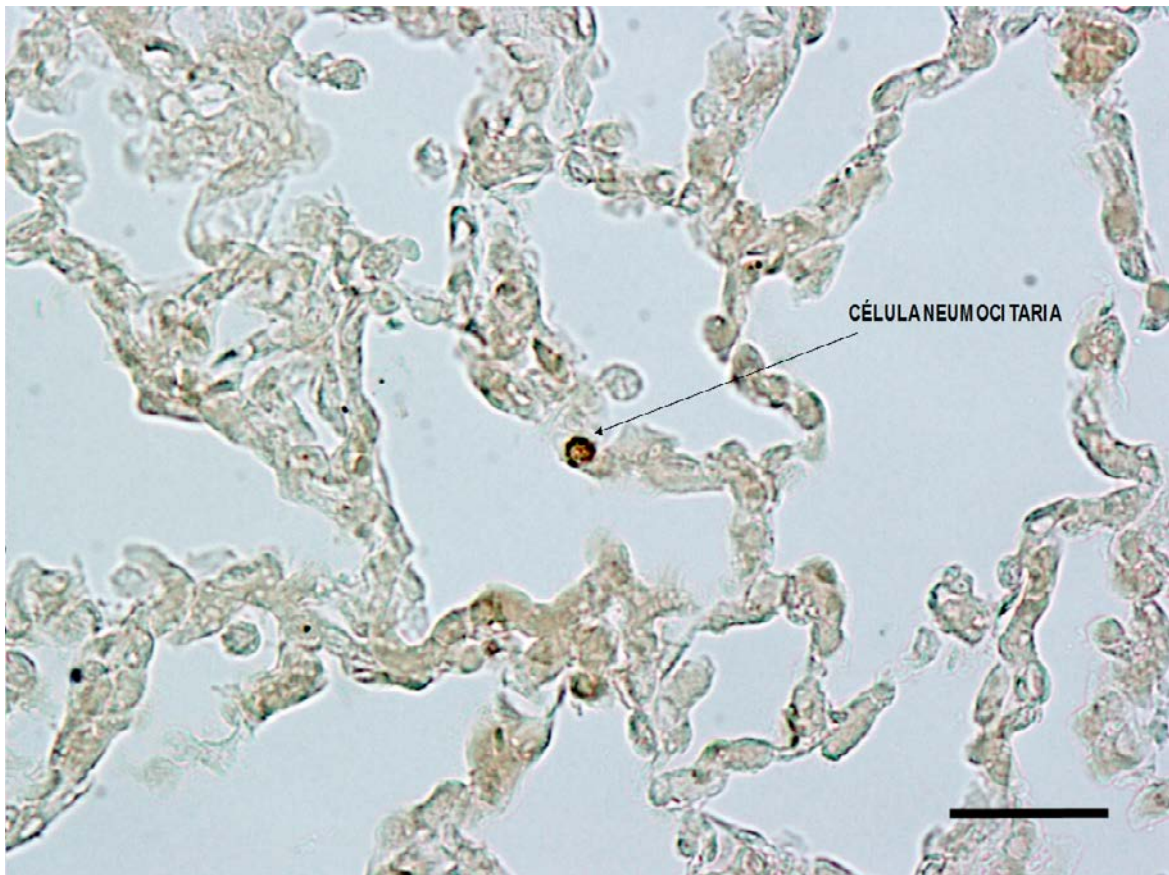


Foto 14. Tinción inmunohistoquímica para MCP-1, correspondiente al grupo control. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Campo pulmonar periférico, con tabiques alveolares conservados, en los que se identifican núcleos de neumocitos, observándose un núcleo neumocitario teñido de manera granular fuerte para MCP-1.

- Estudio analítico:

La isquemia-reperfusión indujo en el tejido pulmonar un aumento de la expresión de células con tinción positiva para MCP-1 en muestras obtenidas de biopsias extraídas a los 60 minutos de la perfusión [8,25 (2,09) vs 1,5 (0,58), CON vs SHAM, $p=0,008$]. En los pulmones del grupo LIDO no se evidencia el aumento de las células con tinción positiva para MCP-1 con respecto al grupo CON, que no recibió tratamiento [2 (0,59) vs 08,25 (2,09), LIDO vs CON, $p=0,013$] (tabla 7, figura 7).

Tabla 7. Análisis cuantitativo de células con tinción positiva para MCP-1 en un área de 0,35 mm² de tejido pulmonar a los 60 minutos de la perfusión.

GRUPO	Nº DE CÉLULAS
CON	8,25 (2,09) * √
LIDO	2 (0,59)
SHAM	1,5 (0,58)

Los resultados se expresan como media (error típico). CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulado. (* $p=0,008$, CON vs SHAM. √ $p=0,013$, CON vs LIDO).

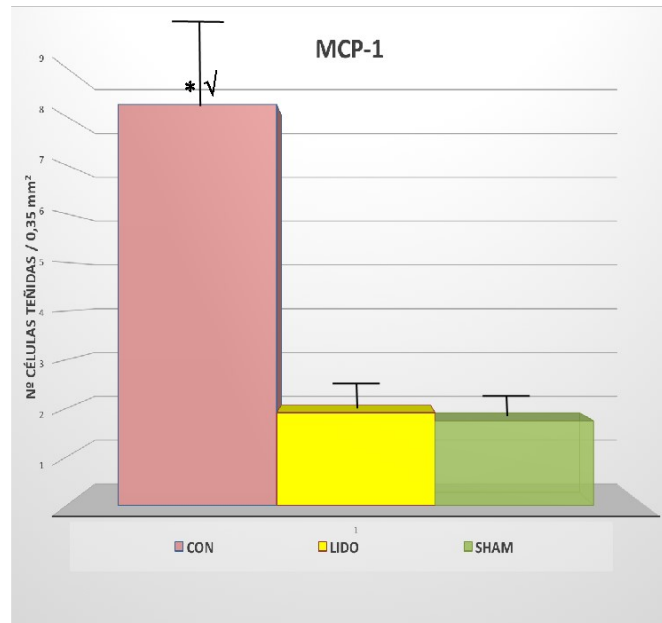


Figura 7. Tinción inmunohistoquímica de MCP-1 en tejido pulmonar a los 60 minutos de la reperfusión. Los resultados se expresan como media del número de células encontradas en 10 campos de 0,35 mm². CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulada (* p= 0,008, CON vs SHAM. √ p= 0,013, CON vs LIDO).

III) Tinción inmunohistoquímica con Bcl-2.

- Estudio descriptivo:

Con este Ac observamos, en campo pulmonar periférico, células neumocitarias (fotos 15 y 17), con tinción citoplasmática y granular, en tabiques alveolares conservados. También destacan macrófagos intersticiales (foto 16) y alveolares (foto 17), con tinción citoplasmática granular.

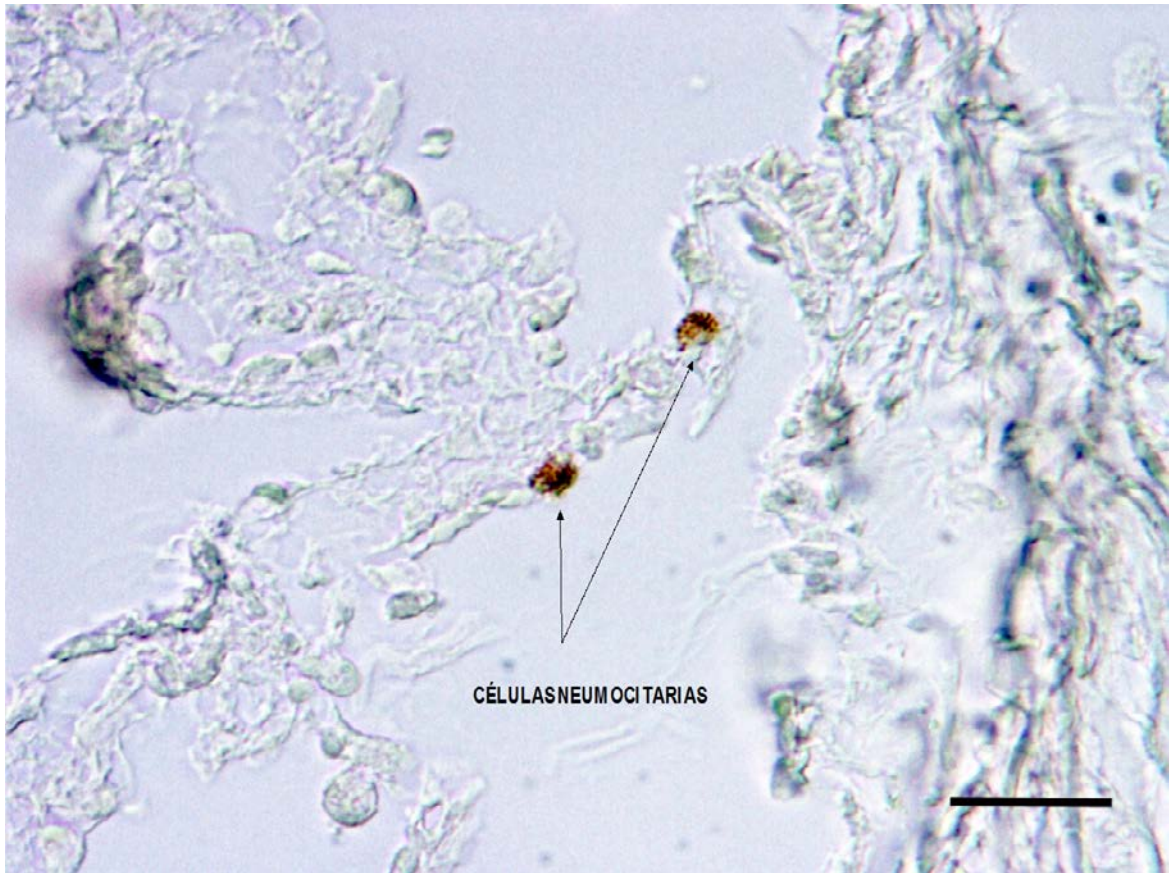


Foto 15. Tinción inmunohistoquímica para Bcl-2, correspondiente al grupo tratado con lidocaína. Campo de 63 aumentos. Marca de escala correspondiente a 10 μ .

Se trata de un campo de gran aumento constituido por parénquima pulmonar periférico. Se observan paredes alveolares en las que se diferencian núcleos de células neumocitarias. En este campo se identifican dos células neumocitarias con tinción positiva de tipo granular y localización citoplasmática.

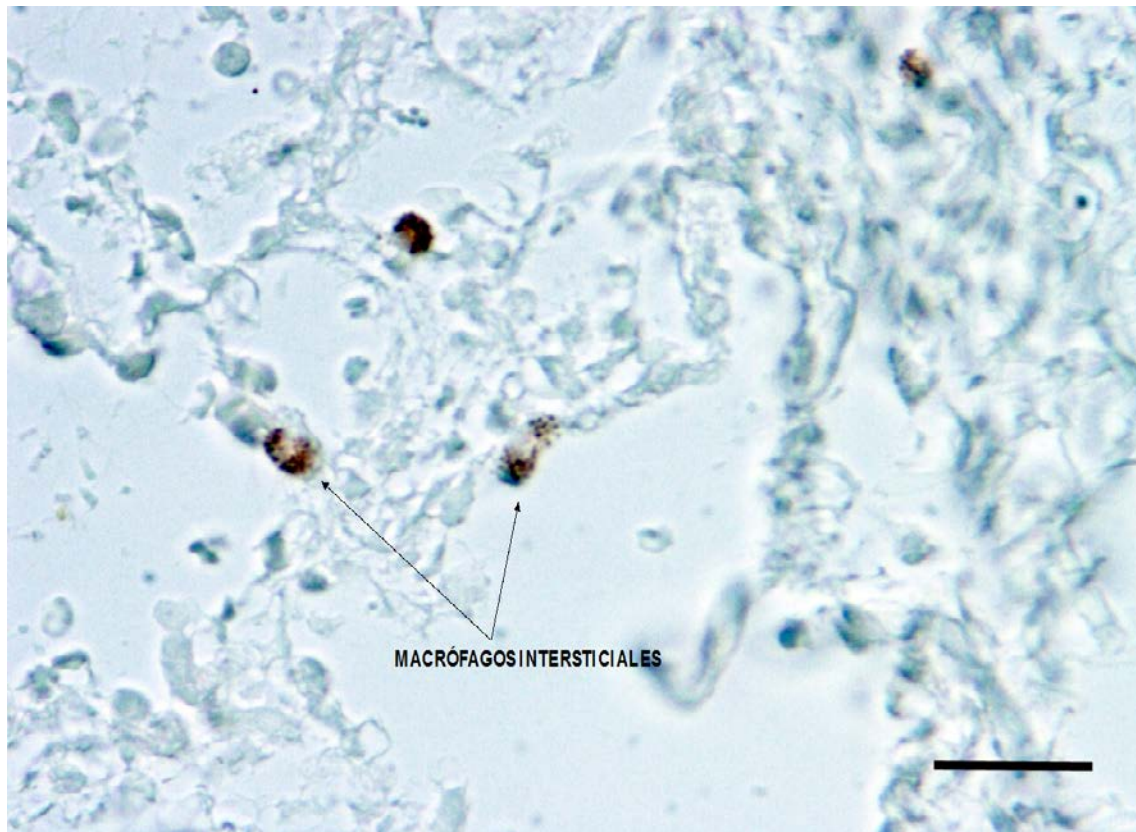


Foto 16. Tinción inmunohistoquímica para Bcl-2, correspondiente al grupo tratado con lidocaína. Campo de 63 aumentos. Marca de escala correspondiente a 10 μ .

Se trata de un campo de gran aumento de parénquima pulmonar periférico en el que se identifican lo que podría corresponder, por localización y morfología, a macrófagos intersticiales, con tinción de tipo granular, de intensidad fuerte y localización citoplasmática.

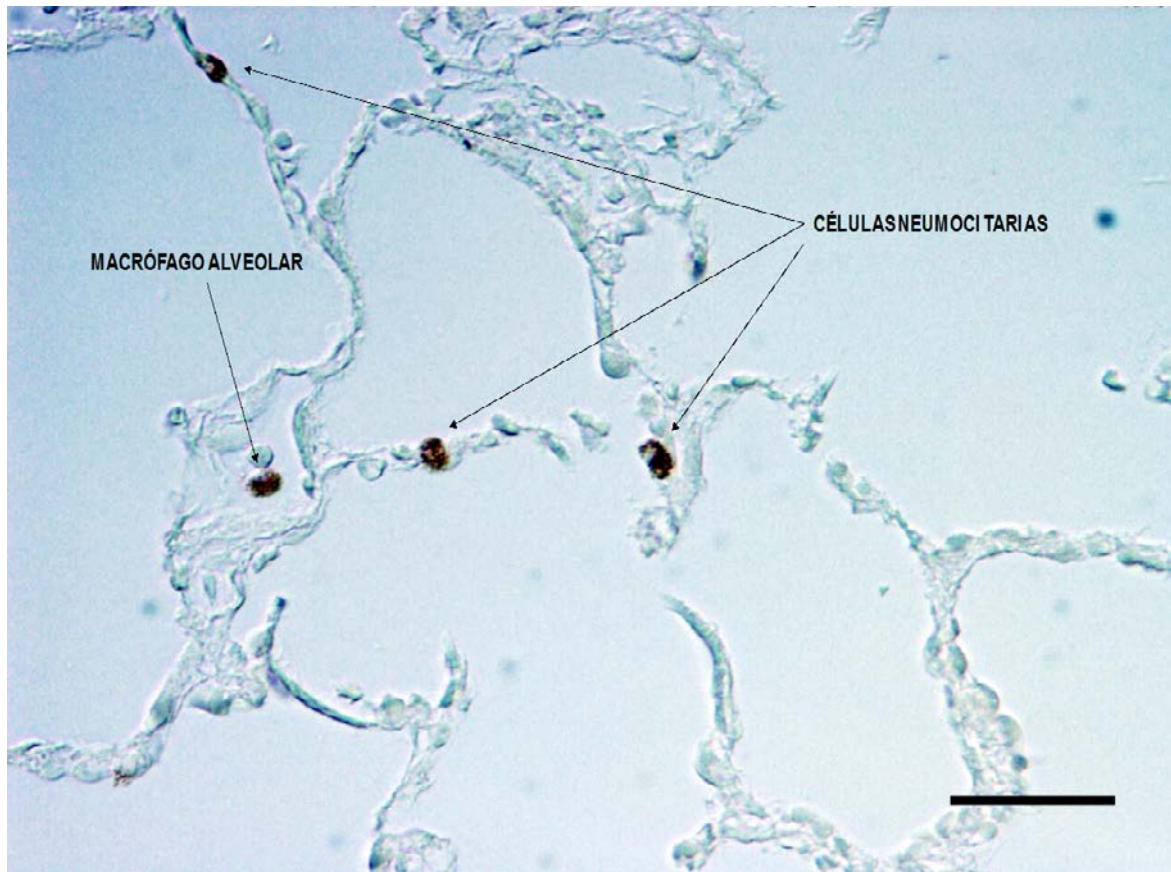


Foto 17. Tinción inmunohistoquímica para Bcl-2, correspondiente al grupo tratado con lidocaína. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Parénquima pulmonar periférico constituido fundamentalmente por paredes alveolares en las que se diferencian claramente núcleos de células neumocitarias. En este campo se identifican hasta tres células neumocitarias con tinción positiva de tipo granular, y una célula, que podría pertenecer a la estirpe monocito-macrofágica, en la luz alveolar.

- Estudio analítico:

En los pulmones del grupo LIDO se observa una elevación del número de células con tinción positiva para Bcl-2 con respecto al grupo SHAM, que no fue sometido a isquemia-reperfusión [7 (2,24) vs 1 (0,44), LIDO vs SHAM, $p= 0,008$]. Este número elevado de células positivas para

Bcl-2 también fue significativamente mayor en el grupo LIDO que en el grupo CON, que no recibió ningún tratamiento [7 (2,24) vs 1 (0,36), LIDO vs CON, p=0,008]. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de Bcl-2 de los grupos SHAM y CON (tabla 8, figura 8).

Tabla 8. Análisis cuantitativo de células con tinción positiva para Bcl-2 en un área de 0,35 mm² de tejido pulmonar a los 60 minutos de la reperusión.

GRUPO	Nº DE CÉLULAS
CON	1 (0,36)
LIDO	7 (2,24) * √
SHAM	1 (0,44)

Los resultados se expresan como media (error típico). CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulado. (* p= 0,006, LIDO vs SHAM. √ p= 0,008, LIDO vs CON).

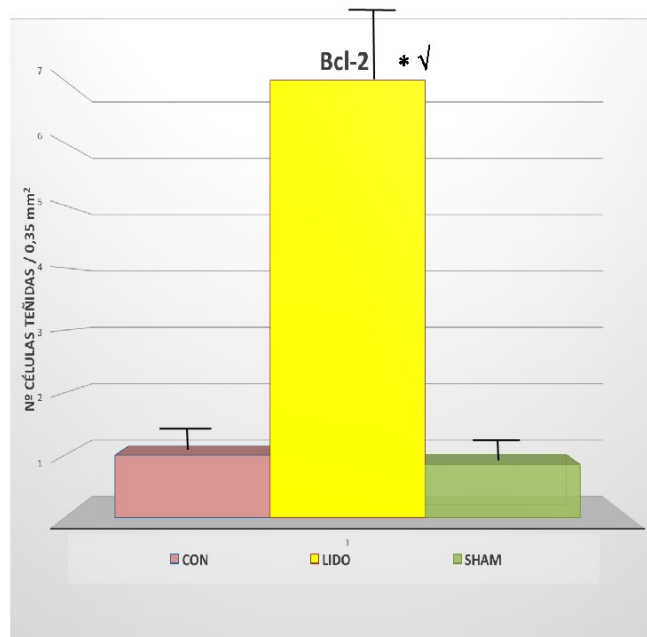


Figura 8. Tinción inmunohistoquímica de Bcl-2 en tejido pulmonar a los 60 minutos de la reperusión. Los resultados se expresan como media del número de células encontradas en 10 campos de 0,35 mm². CON: grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulada. (* p= 0,006, LIDO vs SHAM. √ p= 0,008, LIDO vs CON).

IV) Tinción inmunohistoquímica con caspasa 9.

- Estudio descriptivo:

En la tinción inmunohistoquímica para caspasa 9 se observa, en parénquima pulmonar periférico, predominio de células de estirpe neumocitaria teñidas a nivel citoplasmático (fotos 19 y 20), aunque también puede apreciarse algún neumocito teñido a nivel nuclear. Aunque los tabiques alveolares están mayoritariamente respetados, se observan algunas zonas de colapso alveolar y hematíes en la luz (foto 18).

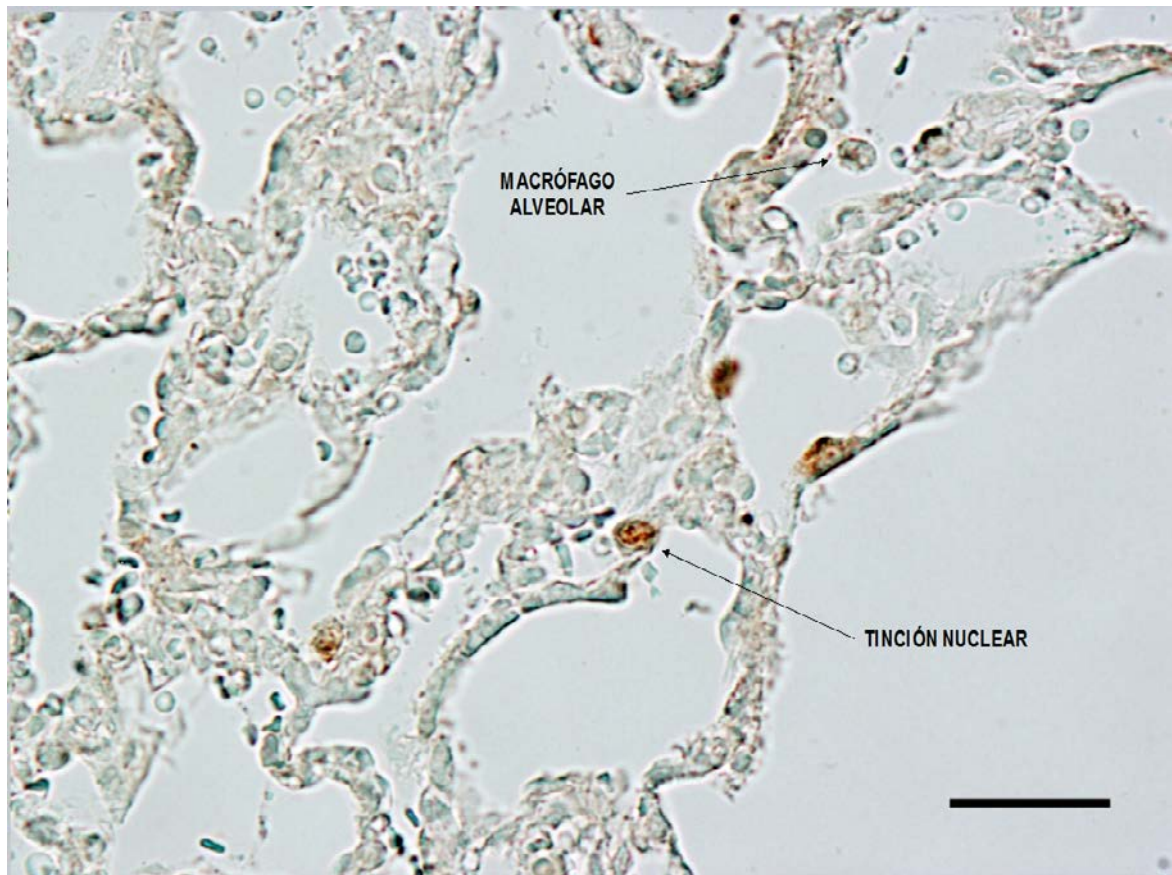


Foto 18. Tinción inmunohistoquímica para caspasa 9, correspondiente al grupo lidocaína. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Se trata de un campo de parénquima pulmonar periférico en el que se identifican claramente paredes alveolares con núcleos de células neumocitarias, alguna zona de colapso alveolar y abundantes hematíes descamados. En este campo destaca la presencia de algún macrófago intraalveolar y también la positividad nuclear de algún neumocito aislado en la pared del alveolo.

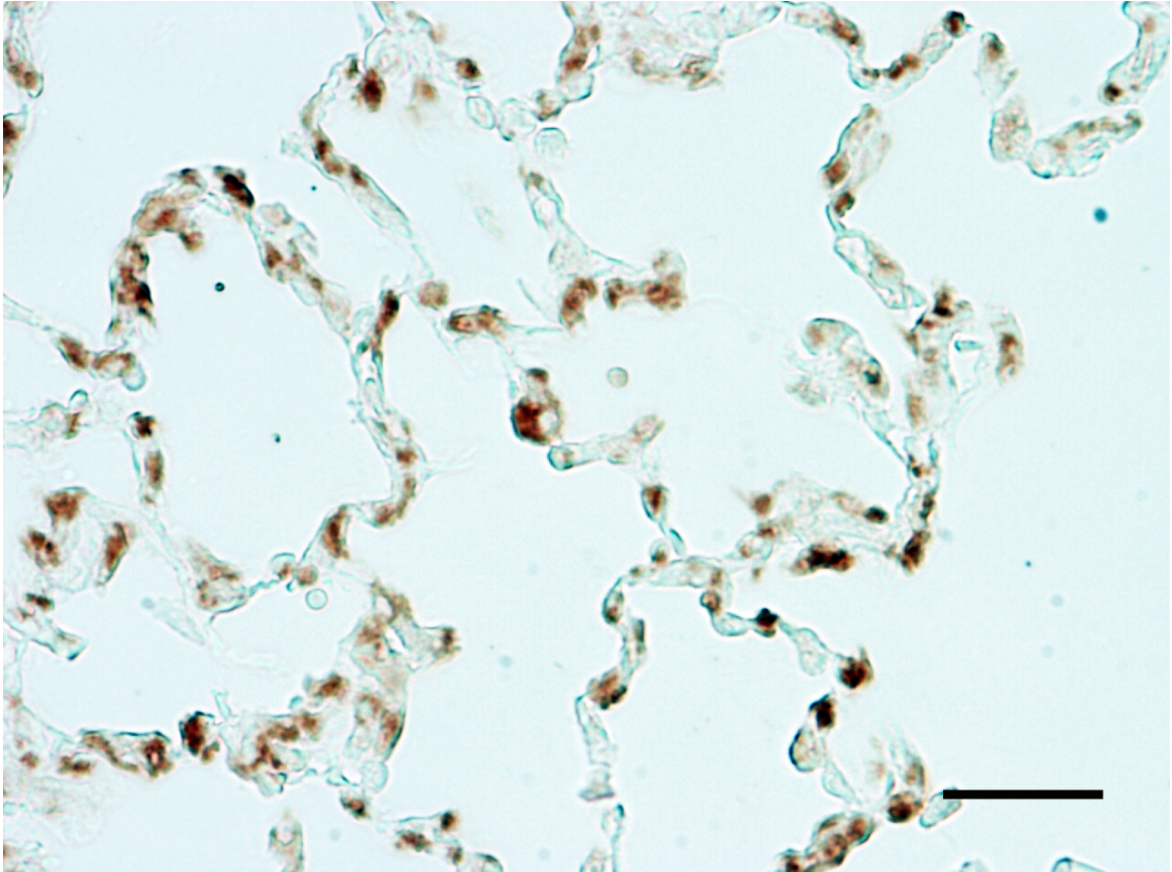


Foto 19. Tinción inmunohistoquímica para caspasa 9, correspondiente al grupo tratado con lidocaína. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Se trata de un campo de parénquima pulmonar periférico en el que se identifican claramente paredes alveolares con núcleos de células neumocitarias y algún hematíe intraalveolar. En las paredes alveolares se observa una tinción positiva y de intensidad moderada o fuerte, de tipo difuso y predominantemente citoplasmática, en las células neumocitarias.

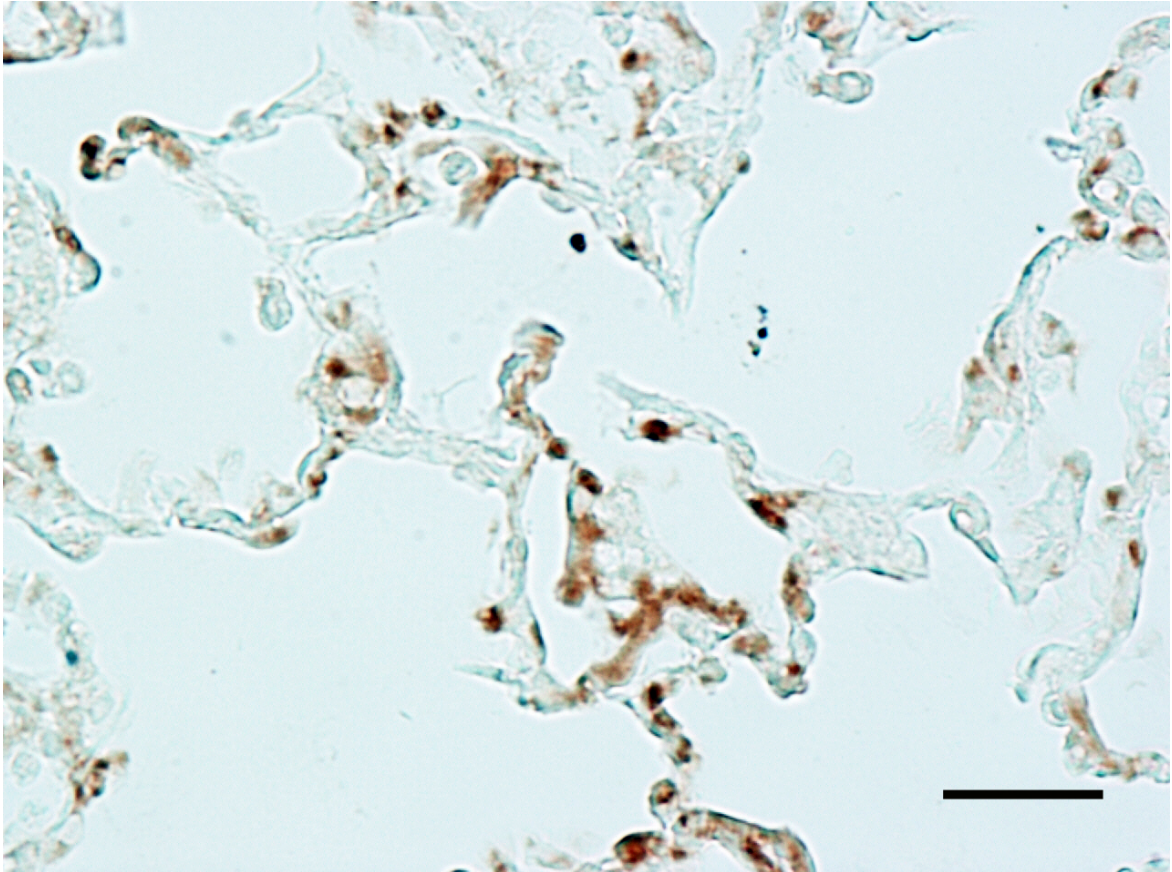


Foto 20. Tinción inmunohistoquímica para caspasa 9, correspondiente al grupo control. Campo de 40 aumentos. Marca de escala correspondiente a 30 μ .

Parénquima pulmonar periférico, en el que se observa tinción citoplasmática de los neumocitos de las paredes alveolares.

- Estudio analítico:

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de caspasa 9 a los 60 minutos de reperfusión entre los tres grupos de estudio (tabla 9).

Tabla 9. Tabla de frecuencia de casos y su porcentaje por grupo según el grado observado de expresión de caspasa 9 a los 60 minutos de reperfusión.

GRUPO	GRADO	N	PORCENTAJE
CON	Ausente	2	33,3%
	< 50%	3	50%
	> 50%	1	16,7%
LIDO	Ausente	4	66,7%
	< 50%	2	33,3%
	> 50%	0	0%
SHAM	Ausente	5	83,3
	< 50%	1	16,7
	> 50%	0	0,0

CON: Grupo control. LIDO: grupo tratado con lidocaína. SHAM: grupo de cirugía simulada. N: frecuencia. La comparación de estos valores entre grupos mostró una $p > 0,05$.

6. DISCUSIÓN

El daño por isquemia-reperusión se presenta en múltiples situaciones clínicas, como el infarto de miocardio, el accidente vascular cerebral, la insuficiencia vascular periférica, el shock, el *bypass* cardiopulmonar, la hepatectomía o la angioplastia coronaria, siendo un escenario paradigmático de este fenómeno el trasplante de órganos (87). El SIR es un proceso complejo, local y sistémico, que disminuye la supervivencia post-trasplante (88). Ya se han expuesto anteriormente las particularidades que presenta el SIR en un órgano como el pulmón. El daño pulmonar causado por el SIR representa una de las principales causas de morbilidad temprana, mortalidad y rechazo del pulmón trasplantado (5,89). Existen numerosas herramientas terapéuticas para minimizar las secuelas del SIR en diferentes órganos. Está demostrado que los AL modulan las cascadas inflamatorias y poseen un efecto protector sobre el SIR de pulmón, corazón e hígado (90,91,92), aunque existe alguna publicación aislada que advierte de su potencial efecto deletéreo, empeorando, por ejemplo, la función renal en casos de SIR (93). Apoyándonos en los datos que apuntan al efecto beneficioso de la lidocaína intravenosa en el SIR secundario a trasplante pulmonar, se diseñó este modelo experimental en cerdos, porque el parecido entre la fisiología humana y la porcina, así como entre sus sistemas inmunitarios, proporciona un conocimiento básico de la recuperación del injerto y de la fisiopatología inflamatoria a través de estudios *in vivo* (94).

El amplio rango y variabilidad de efectos producidos por los AL (especialmente aquellos aspectos que influyen en la activación y respuesta de las células del sistema inmune), sugieren la existencia de una vía más global de actuación que la simple interacción con canales de sodio responsable de su efecto anestésico. En 1972, Philip Seeman (95) ya propuso que los AL *fluidificaban* y alteraban componentes presentes en las membranas celulares, logrando estimular e inhibir enzimas y proteínas asociadas.

Hoy en día estos mecanismos de acción siguen sin entenderse completamente, pero se postula que participan varios canales iónicos (como los de potasio y calcio) y enzimas acopladas a la membrana y al citoesqueleto de la célula. Nuestro estudio de alguna de las capacidades no analgésicas o no bloqueantes de canales de sodio de la lidocaína se encontraría en la misma línea de trabajo que aquellos que arrojan resultados alentadores sobre el papel de la anestesia regional en la reducción del riesgo de metástasis y recidivas (96) o que investigan sobre la atenuación de la inmunosupresión producida por la anestesia regional (97). Por lo que respecta a su administración intravenosa, existen autores que postulan que la administración sistémica de AL durante la cirugía actúa como antihiperalgésico y antiinflamatorios (98,99). Aunque muy escasos, ya existen algunos estudios sobre el efecto de la lidocaína administrada en perfusión intravenosa durante las cirugías de resección pulmonar, con el objetivo de disminuir la respuesta inflamatoria local y sistémica responsable del daño pulmonar y del aumento de morbilidad perioperatoria. Así, nuestros resultados concuerdan con los anteriormente publicados por nuestro grupo de investigación, en los que la lidocaína intravenosa evidenció una expresión disminuida de TNF- α de forma local y sistémica en un modelo de lobectomía animal (2). Estudios previos de nuestro grupo de trabajo también observan un aumento precoz de la expresión bioquímica de IL-1 y RNA mensajero de IL-1 en un modelo porcino de SIR pulmonar (31). La IL-1 dispara una compleja cascada de cambios en la célula endotelial durante el SIR, afectando a la coagulación y a la fibrinólisis, y activando la producción de moléculas de adhesión de membrana (30). Bevilacqua y cols. demostraron que se producía una *sobrerregulación* de RNA de IL-1 en el período de isquemia, de forma tiempo –dependiente. El aumento en su producción se acentuaba en la reperusión, encontrándose elevada 30 minutos después del fin de la isquemia. Estos resultados sugieren que la IL-1 está implicada en

los estadios tempranos de la reperfusión. Una de las limitaciones de nuestro modelo experimental es el corto tiempo de reperfusión estudiado (60 minutos), y el hecho de que se trate de un diseño sin supervivencia del animal a largo plazo, lo que impide constatar la evolución del pulmón trasplantado. El corto tiempo de reperfusión investigado también justificaría que, habiéndose observado menor infiltración inflamatoria y menor cantidad de células de la estirpe monocito-macrófago en los pulmones tratados con lidocaína, no se hayan evidenciado modificaciones en la infiltración por polimorfonucleares en los pulmones sometidos a lidocaína intravenosa, pues estas células son activadas de forma tardía - a partir de cuatro horas postreperfusión (*período neutrófilo dependiente*) - mostrando de esta forma una escasa participación en las primeras horas, donde las células del sistema monocito-macrófago – células cuyo número disminuye en presencia de lidocaína- jugarán el papel primordial (*período neutrófilo independiente*).

6.1 PARÁMETROS RESPIRATORIOS Y HEMODINÁMICOS

Uno de los principales desafíos a los que se enfrenta el anestesiólogo en la cirugía torácica es al mantenimiento de un adecuado aporte de oxígeno a los tejidos durante la ventilación unipulmonar. En nuestro modelo experimental la lidocaína en perfusión continua intravenosa no afectó a la oxigenación arterial. Los efectos vasculares de la lidocaína son complejos, y queda mucho por aclarar acerca de los cambios hemodinámicos – vasoconstrictores, por ejemplo (100) - que produce en territorio pulmonar y que podrían afectar a la ventilación. Se ha descrito su capacidad para

disminuir el índice cardiaco y aumentar la presión arterial media en la arteria pulmonar, la presión de oclusión capilar pulmonar, las resistencias vasculares sistémicas y las resistencias pulmonares sistémicas (101). Estudios previos de nuestro grupo de investigación mostraron una disminución de la PaO₂ en pacientes sometidos a toracotomía con anestesia combinada (general y epidural), aunque la incidencia de hipoxemia fue comparable en ambos grupos. Podría deberse a una inhibición parcial por lidocaína de la vasoconstricción pulmonar hipóxica que se produce en la ventilación unipulmonar, debido a un cierto grado de bloqueo torácico (102). También se ha descrito el resultado opuesto -aumento de la PaO₂ durante la ventilación unipulmonar-, quizá porque la lidocaína aumente el gasto cardiaco y el shunt en este escenario (103). Un tercer estudio reciente no encontró diferencias en oxigenación ni hipoxemia entre los grupos (104).

En nuestro modelo experimental la lidocaína intravenosa, a 1,5 mg/kg/h, precedida de un bolo de 1,5 mg/kg, no produjo tampoco cambios hemodinámicos significativos. No se realizaron mediciones en sangre de los niveles del fármaco, pero existen múltiples publicaciones que avalan el uso seguro de esta posología, no alcanzándose concentraciones plasmáticas tóxicas, es decir, superiores a 5 µg/ml (82,105,106). El uso de lidocaína a altas dosis ha demostrado afectar al inotropismo, cronotropismo, sistema de conducción cardiaco, y cifras de presión arterial (107). Es esencial considerar estos efectos potenciales del fármaco, especialmente en escenarios como el del trasplante pulmonar, ya que la ventilación unipulmonar y la propia cirugía pueden modificar el volumen latido, el gasto cardiaco y el shunt intrapulmonar (108). Garutti y cols. (109) describieron la disminución de la contractilidad miocárdica y del índice cardiaco

durante la ventilación unipulmonar, con lidocaína administrada en el espacio paravertebral. Estos efectos pueden deberse a cierta absorción sistémica del fármaco.

Los hallazgos hemodinámicos y respiratorios de nuestro modelo experimental son clínicamente relevantes, pues el único estudio que existe en trasplante pulmonar con administración de lidocaína intravenosa, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no investiga los cambios hemodinámicos y respiratorios que se producen en este escenario (110).

6.2 EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA LIDOCAÍNA

En el análisis con tinción de hematoxilina-eosina de las biopsias del lóbulo caudal izquierdo a los 60 minutos de reperfusión elegimos los parámetros tradicionalmente descritos en la literatura para investigar el daño pulmonar (111). Así, las lesiones histológicas que estudiamos en nuestro modelo de SIR son el edema peribronquial y perivascular, la congestión vascular y el infiltrado inflamatorio. En lo que respecta a este último aspecto, también evaluamos el tipo de célula inflamatoria implicada. Los pulmones tratados con lidocaína mostraron un grado de congestión menor a los 60 minutos de la reperfusión, así como de su infiltrado inflamatorio. En lo concerniente a las poblaciones celulares estudiadas – linfocitos, polimorfonucleares y macrófagos -, el tejido pulmonar tratado con lidocaína evidenció menor infiltración por células monocito-macrofágicas.

El efecto antiinflamatorio en el SIR pulmonar que hemos observado con la lidocaína concuerda con otras publicaciones internacionales, en las que los AL han demostrado disminuir el daño pulmonar inducido en modelos animales (84,106, 112, 113, 114,115). En lo que respecta al SIR pulmonar, en el único estudio encontrado, Das y cols. describen como la perfusión intravenosa de lidocaína en pulmones aislados sometidos a isquemia-reperfusión evidencia un menor ratio *pulmón húmedo/pulmón seco*, una menor presión en arteria pulmonar y una menor presión pico (116), pero no estudian ningún parámetro inflamatorio. Existen autores que lo han hecho en SIR de otros órganos, - como el corazón (117)-, pero sólo hay un estudio que investiga el efecto antiinflamatorio de la lidocaína intravenosa en el contexto del trasplante pulmonar, para describir menor adhesión y migración de polimorfonucleares en el grupo tratado con lidocaína (110).

En nuestro modelo, en el grupo tratado con lidocaína intravenosa se objetivó una disminución de la congestión - entendida como la presencia de vasos dilatados y rellenos de hematíes - en el pulmón trasplantado a los 60 minutos de perfusión. Este dato es de gran relevancia clínica, pues está probado que la disfunción microvascular media muchos de los fenómenos locales y sistémico del daño por isquemia-reperfusión, afectando especialmente a las arteriolas, los capilares y las vénulas. Esta disfunción vascular es fruto de cambios en la integridad de la propia célula endotelial que repercuten en el tono vascular. La biodisponibilidad de NO, un importante vasodilatador, se ve claramente mermada durante el período de perfusión, lo que se traduce en una disfunción de la vasodilatación arterial. La liberación de mediadores inflamatorios y el aumento en la expresión de molécula de adhesión activan cascadas inflamatorias y coagulantes que culminan en la oclusión de capilares, fenómeno

conocido como el *no-reflujo*. En las vénulas postcapilares, el reclutamiento y trans migración de leucocitos compromete aún más la integridad de la barrera endotelial y aumenta el fenómeno oxidativo, produciendo edema tisular (118). En lo que respecta al edema, la lidocaína no afectó a su aparición ni intensidad a los 60 minutos de reperfusión. La capacidad para disminuir el edema en el SIR de varios órganos ha sido demostrada por varios AL, entre los que se encuentra la lidocaína (110,116,119,120). En pulmón también se ha descrito que el tratamiento en el postoperatorio precoz con lidocaína atenúa el edema pulmonar (121). El mecanismo responsable parece ser la disminución de la liberación de leucotrienos por parte de los polimorfonucleares humanos activados y de los monocitos (122,123).

Tradicionalmente, se considera al edema pulmonar el responsable de la disfunción del pulmón trasplantado, así como la mejor indicación histológica de tejido dañado como consecuencia de la isquemia-reperfusión. A su vez, la progresión clínica después de un trasplante pulmonar está relacionada con el tiempo de isquemia. Actualmente, en la práctica clínica habitual se considera que la duración aceptable del período de isquemia que puede sufrir el órgano trasplantado es de 6 a 8 horas (124,125,126,127) aunque se sospecha que esos límites podrían excederse (89). Santana y cols. (86), en un modelo animal de trasplante pulmonar con tiempos prolongados de isquemia (de 4, 6 y 10 horas) observaron que la evolución clínica era similar en todos los grupos y que no había diferencias significativas en los marcadores histológicos de isquemia-reperfusión utilizados. Además, la severidad del edema no se correlacionaba con un mayor grado de congestión vascular, infiltración inflamatoria, o rechazo agudo. Nuestro experimento no muestra una disminución del edema significativa en el grupo de la lidocaína. El tiempo medio de isquemia, en los cerdos tratados con lidocaína, fue de 125 minutos,

llamativamente menor que los tiempos descritos en la literatura, por lo que una hipótesis que podría explicar la ausencia de efecto demostrado de la lidocaína sobre el edema es esta corta duración de los tiempos de isquemia de nuestro experimento.

En lo que respecta a la inflamación, resulta complejo resumir en pocas palabras el efecto de la lidocaína en la cascada inflamatoria, pues su acción resulta ser una espada de doble filo. Nuestro estudio mostró una disminución significativa, en los cerdos tratados con lidocaína, del infiltrado inflamatorio del pulmón sometido a isquemia-reperfusión, y concretamente de la estirpe celular del sistema de monocitos-macrófagos, dato confirmado tanto por el análisis de la morfología celular en las tinciones de hematoxilina-eosina, como por la detección de su principal antígeno de superficie, CD68, en las técnicas de inmunohistoquímica. Aunque los AL han demostrado tener acciones antibacterianas y múltiples efectos beneficiosos en la respuesta inflamatoria (90,128) también son conocidos por sus efectos deletéreos en la función inmunitaria (129,130). Los efectos descritos en la literatura son dispares. Nuestros resultados antiinflamatorios apuntan en la misma dirección que aquellos que describen que los AL producen disfunción en los neutrófilos del SIR (129), en células *natural killer* (131) y en monocitos (130). También inhiben la adhesión (110,132,133,134,135,136), y la motilidad leucocitaria (137,138). Aunque los mecanismos aún son desconocidos, parece poco probable que los efectos antiinflamatorios mencionados y evidenciados en nuestro modelo experimental se produzcan a través del bloqueo de canales de sodio (139). Se postula que parte del mecanismo implica liberación de prostaciclina del endotelio (140) e interferencia con las acciones de las integrinas y de la molécula de adhesión (141).

Nuestro modelo experimental muestra una disminución del número de monocito-macrófagos del infiltrado inflamatorio en los animales que recibieron lidocaína intravenosa durante la isquemia-reperfusión. Los macrófagos residentes pulmonares son células de larga vida, que se encuentran en el intersticio pulmonar y alveolos, y que son reclutados en respuesta al estímulo inflamatorio. El papel de los macrófagos residentes y reclutados en la iniciación y el mantenimiento de la inflamación en el daño pulmonar se ha demostrado sobradamente, pero algunos estudios van más lejos y apuntan a que estas células son también las principales responsables de la resolución del cuadro inflamatorio (142). Diferentes modelos de inflamación pulmonar han demostrado que los macrófagos alveolares son la principal fuente de TNF- α (143,144,145), promotor fundamental de la apoptosis en neutrófilos (146). En un modelo de sepsis se ha descrito que este retraso en la apoptosis de los neutrófilos está asociado con el mantenimiento del potencial transmembrana mitocondrial y con reducción de la actividad de caspasa 9 (147). Nuestro estudio muestra como en el grupo tratado con lidocaína disminuye el número de macrófagos, pero no así la caspasa 9. Podría postularse que quizá sea debido a que parte de la disminución de caspasa 9 sea precisamente secundaria a la actividad macrofágica exacerbada (y a su intento de inhibir la apoptosis de los neutrófilos), disminuida en nuestro experimento. En cualquier caso, son necesarios más estudios experimentales que profundicen en esta línea de investigación.

Los AL también inducen una inhibición de la fagocitosis de leucocitos humanos (148). Se postula que el mecanismo implicado puede ser la alteración de la expresión del receptor de superficie del leucocito y la inhibición de la actividad de los filamentos de actomiosina (149). Además está documentada la inhibición de la actividad metabólica del leucocito y de la formación de aniones superóxido por los AL (79,83,122). Varios

estudios clínicos (150,151) en pacientes tratados con lidocaína intravenosa muestran que esta inhibición es dosis-dependiente (129,152,153) y probablemente debida a la interferencia con el calcio que induce la formación mitocondrial de RLO (154).

Se ha relacionado la acción inhibitoria de la motilidad leucocitaria de los AL con sus efectos sobre el citoesqueleto (155,156) confirmados ya en una gran variedad de estirpes celulares, como queratinocitos, eritrocitos, plaquetas, células musculares, fibroblastos, neuronas y células tumorales. Por último, entre las vías de acción sugeridas destaca la inhibición de la liberación de agentes quimioatrayentes por parte de los leucocitos, como MCP-1 (157), dato que concordaría con la disminución de este marcador de inflamación en los pulmones sometidos a SIR y tratados con lidocaína, objetivada en nuestro estudio experimental.

En el ámbito del trasplante pulmonar en humanos, se ha descrito la importancia de MCP-1 en la disfunción primaria del injerto y su utilidad pronóstica como biomarcador (43,158). Además de permitir la trans migración de monocitos circulantes a los tejidos, MCP-1 produce otros efectos sobre estas células, como inducción de anión superóxido, quimiotaxis y flujo de calcio (159). Altemeier y cols. (44), en un modelo de SIR unipulmonar en ratones, objetivaron, mediante inmunohistoquímica, *sobrerregulación* de MCP-1 y disfunción vascular en ambos pulmones, como resultado directo del SIR unilateral. Nuestro grupo ha observado previamente que el SIR pulmonar cursa con aumento de MCP-1, TNF- α e IL-1, y que el preconditionamiento isquémico reduce significativamente la expresión de todos estos mediadores (39). Li y cols. (157) postularon que la lidocaína causa una inhibición dosis-dependiente de la secreción de MCP-1 en cultivos de monocitos humanos, así como la supresión de la expresión del

RNA mensajero de MCP-1 inducida por lipopolisacárido, sugiriendo que la inhibición de MCP-1 se produce a nivel transcripcional. De forma similar, Sasagawa y cols. (138) describieron el efecto inhibitorio de la lidocaína sobre la quimiotaxis de los neutrófilos. Es conocido desde hace años el hecho de que la lidocaína inhibe la acumulación de calcio y disminuye el influjo de este ion en los mastocitos (160). La lidocaína reduce dramáticamente el pico de calcio inducido por MCP-1 en los monocitos, sugiriendo que es capaz de suprimir la activación monocítica desencadenada por MCP-1 en el proceso inflamatorio. Por último, destacar que entre las aplicaciones clínicas de las propiedades antiinflamatorias se encuentra la administración de lidocaína en la zona de la herida quirúrgica, lo que reduce la migración leucocitaria y la activación metabólica en la zona (137). Es posible que los efectos de la lidocaína en la curación de las heridas sean debidos, al menos en parte, a la modulación de la producción de MCP-1. Nuestro modelo experimental mostró, en los cerdos no tratados con lidocaína, un aumento significativo de la producción de MCP-1 en el pulmón trasplantado, medido con técnicas de inmunohistoquímica.

La misma técnica nos ha permitido objetivar un aumento de la expresión de CD68 en el grupo de cerdos no tratados con lidocaína intravenosa, lo que concuerda con los datos histológicos que apuntaban a una mayor infiltración en el pulmón trasplantado de estos animales por células del sistema monocito-macrófago, ya que este antígeno es una glicoproteína intracelular que se expresa principalmente en macrófagos tisulares y monocitos. Esta molécula se ha usado en pulmón para estudiar el infiltrado inflamatorio secundario a daño pulmonar inducido en modelos animales (161), el papel de los macrófagos en la patogénesis del daño pulmonar secundario a pancreatitis aguda (19) y las diferentes poblaciones implicadas en la fibrosis pulmonar inducida (162).

Los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental en la expresión de MCP-1 y CD68 en el grupo de cerdos tratados con lidocaína pueden interpretarse como un paso adelante en la confirmación de que las propiedades antiinflamatorias de la lidocaína intravenosa, unido a su demostrado perfil de seguridad a las dosis empleadas, pueden constituir una valiosa arma terapéutica en el tratamiento del SIR pulmonar.

Los efectos antiinflamatorios de los AL apenas descritos son de gran relevancia clínica. Los AL se usan extensamente en la práctica médica habitual con finalidad analgésica. Una cuestión fundamental que nos planteamos en el diseño de nuestro experimento es si hoy en día podríamos beneficiarnos de sus propiedades antiinflamatorias simultáneamente, y de si esto sería provechoso o deletéreo para el paciente. Con lo expuesto hasta el momento queda claro que el interés de los AL no reside únicamente en su capacidad para bloquear estímulos nociceptivos a través del bloqueo de los canales de sodio. Aunque sus mecanismos de acción están lejos de ser completamente dilucidados, nuestro conocimiento actual de su capacidad inhibitoria de la inflamación neurogénica local, de los fenómenos de sensibilización y cronificación del dolor y el estudio de sus mecanismos antiinflamatorios intrínsecos abren una vía para la creación de nuevas herramientas terapéuticas en múltiples escenarios clínicos de gran relevancia, como es el SIR secundario a trasplante pulmonar.

6.3 EFECTO ANTIAPOPTÓTICO DE LA LIDOCAÍNA

La apoptosis es un fenómeno clave en el SIR pulmonar. Cooke y cols., en un estudio animal de trasplante pulmonar, describieron que la sobreexpresión de Bcl-2 atenúa el estrés oxidativo en el pulmón trasplantado, disminuyendo la actividad de IL-1 y la activación de la vía de las caspasas (54). El uso de técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos para neoepitopos de caspasas representa un método específico de detección de apoptosis en tejidos fijados en parafina, lo que constituye una ventaja respecto a otros sistemas. Está ampliamente demostrado que en la apoptosis del SIR post-trasplante está involucrada la cascada de las caspasas. Estudios inmunohistoquímicos de SIR en pulmón revelan positividad para caspasa 3 en macrófagos alveolares e intersticiales (163,164). También la inmunohistoquímica de Bcl-2 es de gran utilidad, como observaron Yousefi y cols. en su estudio de daño pulmonar inducido por SIR en riñón (165), donde demuestra un descenso en la producción pulmonar de Bcl-2 a las 24 de perfusión. Estudios con inmunohistoquímica en SIR pulmonar sometido a preconditionamiento (166) muestran que esta estrategia terapéutica atenúa significativamente la *sobrerregulación* de proteína Bax, aumentando la expresión de Bcl-2, y produciendo una mejoría significativa del ratio Bcl-2/Bax. Yang y cols. (167) sugirieron que el preconditionamiento isquémico puede reducir la apoptosis en células pulmonares humanas *in vivo* mediante *sobrerregulación* de Bcl-2.

En nuestro modelo experimental, los cerdos tratados con lidocaína fueron sometidos a una cirugía de menos de 4 horas de duración (255 minutos de media), observándose un

aumento de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en pulmón sometido a isquemia-reperfusión, sin objetivar modificaciones en la expresión de caspasa 9. Para una mejor comprensión de estos hallazgos se profundizará en las distintas duraciones de la isquemia y la perfusión en distintos modelos de SIR, así como en la compleja relación entre lidocaína y apoptosis.

Los hallazgos arriba descritos fueron observados en biopsias pulmonares del lóbulo trasplantado tras 60 minutos postreperfusión. En el trasplante pulmonar, periodos cortos de isquemia (de 20 minutos) no están asociados a muerte por necrosis o apoptosis (11). Si el periodo de isquemia, sin perfusión, se prolonga varias horas (hasta 18), se observa una gran cantidad de necrosis celular, aunque no fenómenos de apoptosis (49). En presencia de isquemia y perfusión, el escenario es el siguiente: sometiendo al pulmón a isquemias frías inferiores a 12 horas, predomina la muerte por apoptosis, mientras que periodos de conservación mayores de 12 horas se asocian a un aumento de la muerte por necrosis. En el ámbito del trasplante pulmonar en humanos, los fenómenos apoptóticos prácticamente no se identifican en periodos de isquemia fría o caliente de hasta 5 horas (11,66). Solo tras la perfusión se evidencian los fenómenos apoptóticos, aumentando en el tiempo hasta un pico de 2 horas postreperfusión y descendiendo después. Esta apoptosis de células pulmonares parece, según algunos autores, ser independiente del período de isquemia (49). Hassoun y cols. (168), sin embargo, en un modelo de estudio del daño sistémico producido tras una hora de clampaje del pedículo renal, objetivaron un aumento en la expresión de caspasa 3 en pulmón a las 6, a las 24 y a las 36 horas, medido por técnicas de inmunohistoquímica. Lei y cols., en un modelo de SIR cerebral en ratas, tras 90 minutos de isquemia y 4 y 24 horas postreperfusión, describe una menor expresión de caspasa 3 en tejidos tratados

con lidocaína, a las 4, pero no a las 24 horas de reperfusión (78). Y de Graff y cols., para terminar de sembrar la controversia, en un modelo de SIR hepático con 60 minutos de isquemia, en el que se administraba lidocaína hasta 20 minutos después de iniciar la reperfusión, no objetivaron disminución de caspasa 3 en el grupo tratado (169).

En lo que respecta a las vías de apoptosis y al tiempo de isquemia, Syed describió que hasta el 30% de las células de pulmones humanos trasplantados, con una buena función, son apoptóticas a las 2 horas de la reperfusión (10), y que esta apoptosis del trasplante pulmonar está mediada por la cascada de las caspasas - concretamente por la activación de caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9 -, lo que demuestra que, aunque nuestro modelo sólo estudia la vía intrínseca de la apoptosis, ambas, la extrínseca y la intrínseca, juegan un papel esencial en este fenómeno. En el modelo experimental de este autor también se describe un hallazgo llamativo: los fenómenos apoptóticos empiezan antes de lo descrito en otras publicaciones antes mencionadas, ya en la fase de la isquemia fría, pero siguen un patrón de activación de caspasas desigual. Así, se observa un aumento de la expresión de caspasa 3 y caspasa 8 inmediatamente tras el inicio de la isquemia fría, que sin embargo no alcanza niveles significativos en el caso de caspasa 9. Estos hallazgos son opuestos a los comentados anteriormente, en los que se exponía el escepticismo de muchos autores respecto a la relación de dependencia entre tiempos de isquemia y apoptosis (49). En los pulmones trasplantados tras 6 horas de isquemia fría ya se describe aumento significativo de las tres caspasas (3,8 y 9). Este mismo autor también destaca que el porcentaje de células apoptóticas es menor del esperado, comparándolo con estudios previos (66). Es llamativo el diferente comportamiento exhibido por caspasa 9 en este modelo, quizá relacionado con la ausencia de

significación observada en el nuestro, que manejaba tiempos medios de isquemia de 125 minutos.

Probablemente sea necesario realizar estudios con distintos tiempos de reperfusión y de isquemia para dilucidar el verdadero efecto de la lidocaína sobre las caspasas. Para la mejor comprensión de estos hallazgos se profundizará en el ambiguo papel que juega la lidocaína en la apoptosis, pues algunos autores sugieren que este fármaco la inhibe, otros que la induce, y otros que efectivamente la promueve, pero únicamente en estirpes celulares concretas, como las tumorales, pero no lo hace en tejidos sanos (170,171).

Parte de la literatura publicada apunta que los AL inhiben la proliferación, suprimen la migración celular y disminuyen la apoptosis cuando se utilizan en un rango de dosis concreto (172,173,174). Los mecanismos subyacentes todavía no están claros. Algunas hipótesis los relacionan con el bloqueo de los canales de sodio (175,176), pero otros discrepan (177,178,179). Ya se ha mencionado a de Graaf y cols. (169), cuyo modelo no mostró ningún beneficio de la lidocaína en el daño hepatocelular ni en la función hepática postoperatoria tras isquemia-reperfusión. Se desconoce la causa por la que este AL sí protege del SIR en corazón (180), cerebro (78) y pulmón pero no lo hace en hígado. En estos órganos, sus propiedades protectoras parecen deberse a la modulación de la respuesta inflamatoria y/o a la inhibición de la apoptosis celular. Resultados intermedios se encuentran en otros artículos, como el de Ebel y cols. (153), quienes estudiaron el efecto de la lidocaína en un modelo experimental animal de SIR en corazón, describiendo que ésta protege al miocardio de la isquemia pero no del daño de la reperfusión, o Guschlbauer y cols. (181), quienes examinaron los efectos de la lidocaína en el músculo liso de intestino delgado equino sometido a isquemia-

reperfusión y constataron que el efecto beneficioso de la lidocaína sobre el SIR era mayor en células dañadas que en las sanas, por un mecanismo todavía no bien dilucidado.

Ya se ha mencionado que nuestro experimento estudia la vía intrínseca de la apoptosis, sobre la que la lidocaína ha demostrado actuar. Werdehausen y cols. (182) observó que la lidocaína inducía apoptosis y que ésta era abolida en células genéticamente modificadas para carecer de caspasa 9 o sobreexpresar Bcl-2, es decir, que su efecto es mediado por la vía mitocondrial o intrínseca. Wang y cols. también han constatado que el tratamiento con este fármaco induce apoptosis, y postulan que, inicialmente, la lidocaína activaría la vía extrínseca, dependiente de receptores de la muerte. También facilitaría la disfunción mitocondrial y en última instancia podría también activar la vía intrínseca (183). Este dato es relevante, ya que Syed y cols. (10) han evidenciado que ambas vías están implicadas en el SIR del trasplante pulmonar. Además de estas dos vías clásicas, la producción de RLO también estaba aumentada en el estudio de Wang, lo que indicaba activación de la apoptosis por la vía asociada a la proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK) (183). Este mecanismo de acción proapoptótico de la lidocaína descrito por Wang y cols. ha sido señalado ya en otros estudios, que han sugerido que los AL podrían inducir apoptosis en células humanas de cáncer de tiroides a través de las vía MAPKs (184), y otros que la inhibición de las vías de actuación de MAPK protegen contra la neurotoxicidad inducida por AL (185).

Destaca el hecho de que Wang y cols. (186), en otro estudio más reciente que el mencionado anteriormente, sobre el efecto de algunos AL en la apoptosis del cáncer de pulmón *in vitro*, comprobaron que la lidocaína inhibía el crecimiento celular, así como

la migración y la capacidad de invasión de las células tumorales. El efecto antiproliferativo de la lidocaína en tejidos tumorales concuerda con otros hallazgos publicados (187).

Werdehausen y cols. (188), en otro estudio *in vitro* en el que incubó células con diferentes AL durante 24 horas para determinar su potencia inductora de apoptosis determinaron que la concentración de lidocaína necesaria para producir muerte celular en el 50% de las células de la muestra era mucho más elevada que la de la mayoría de los AL utilizados en la práctica clínica y también que la alcanzada habitualmente en la práctica clínica con este fármaco. Otros autores (189,190) que llegaron a conclusiones semejantes también utilizaron dosis muy elevadas. Como se ha explicado anteriormente, se puede suponer que las concentraciones plasmáticas de nuestro experimento estarán en torno a 5 µg/ml, por analogía con otros modelos. Las dosis utilizadas por los autores anteriormente mencionados son cien veces superiores y con tiempos de exposición a la lidocaína mucho más prolongados, lo que puede justificar la discrepancia de resultados. La dosis empleadas en los estudios que investigan el efecto antiapoptótico usan rangos antiarrítmicos de lidocaína. En nuestro estudio administramos un bolo de 1,5 mg/kg de lidocaína, seguido de una perfusión continua de 1,5 mg/kg/h, posología muy similar a la descrita en otros estudios de isquemia de órganos y lidocaína (2,78).

En resumen, nuestro modelo experimental muestra una respuesta inflamatoria y congestiva menor en el tejido pulmonar tratado con lidocaína, así como una disminución de la activación de las vías quimiotácticas mediadas por MCP-1 y de la infiltración tisular por células del sistema monocito-macrófago, identificadas por su Ag de superficie CD68. La capacidad de la lidocaína para modular la apoptosis del SIR en

este mismo escenario también ha sido estudiada, obteniéndose resultados controvertidos y acordes a lo descrito en la literatura internacional. Se ha evidenciado un aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en tejido pulmonar de los pulmones tratados con este AL. La disminución en la expresión de una de las principales proteínas ejecutoras de apoptosis, caspasa 9, aunque ha resultado mayor en el grupo tratado con lidocaína que en el no tratado, no ha alcanzado niveles de significación estadística. Nuestro experimento arroja resultados esperanzadores sobre el papel antiapoptótico de la lidocaína intravenosa y el adecuado perfil de seguridad de esta vía de administración a las dosis utilizadas, que además parecen las adecuadas para obtener el efecto deseado. Son necesarios más estudios que profundicen en la relación de la lidocaína con la expresión de caspasas y su relación con los tiempos de isquemia y reperfusión, además de investigar la relación entre la activación macrofágica y la disminuida producción de caspasas por parte de los neutrófilos activados. La capacidad antiapoptótica del fármaco supone un paso más en el diseño de nuevas herramientas terapéuticas en el ámbito de la oncología, de la sepsis y, como no, del trasplante de órganos y resto de fenómenos que cursan con SIR.

7. CONCLUSIONES

1. En el presente modelo de autotrasplante pulmonar, la isquemia-reperfusión ya induce cambios en tejido pulmonar teñido con hematoxilina-eosina, a los 60 minutos de perfusión, destacando un mayor grado de infiltración por células del sistema monocito-macrófago y una mayor congestión capilar; estos efectos son atenuados por la administración intravenosa de lidocaína.
2. La tinción inmunohistoquímica con Anti-CD68 confirma que la isquemia-reperfusión induce un aumento de la infiltración por células del sistema monocito-macrófago en tejido pulmonar a los 60 minutos de la perfusión; con la administración de lidocaína este incremento no fue evidente.
3. El estudio inmunohistoquímico muestra un significativo aumento de células neumocitarias y monocíticas que expresan la proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1; la administración de lidocaína parece prevenir este efecto.
4. La administración intravenosa de lidocaína indujo un aumento de células que expresan la proteína Bcl-2, por lo que la lidocaína podría desempeñar un papel protector frente a la apoptosis inducida por isquemia-reperfusión pulmonar.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Rancan L, Huerta L, Cusati G, Erquicia I, Isea J, Paredes SD, et al. Sevoflurane Prevents Liver Inflammatory Response Induced by Lung Ischemia-Reperfusion. *Transplantation*. 2014 Dec;98(11):1151–7.
2. Garutti I, Rancan L, Simón C, Cusati G, Sanchez-Pedrosa G, Moraga F, et al. Intravenous lidocaine decreases tumor necrosis factor alpha expression both locally and systemically in pigs undergoing lung resection surgery. *Anesth Analg*. 2014 Oct;119(4):815–28.
3. Di Napoli P, Taccardi AA, De Caterina R, Barsotti A. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: experimental data. *Ital Heart J*. 2002 Jun;3 Suppl 4:24S–28S.
4. Kaszaki J, Wolfárd A, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2006 Apr;38(3):826–8.
5. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Feb 15;167(4):490–511.
6. Kelly RF. Current strategies in lung preservation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. Elsevier; 2000 Dec;136(6):427–40.
7. Espinosa M, Rodil R, Goikoetxea MJ, Zulueta J, Seijo LM. Trasplante pulmonar. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2006;29.
8. Laubach VE, Sharma AK. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2016 Jun;21(3):246–52.
9. Hengst den WA, Gielis JF, Lin JY, Van Schil PE, De Windt LJ, Moens AL. Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. American Physiological Society; 2010 Nov;299(5):H1283–99.
10. Quadri SM, Segall L, de Perrot M, Han B, Edwards V, Jones N, et al. Caspase inhibition improves ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2005 Feb;5(2):292–9.
11. Fischer S, Maclean AA, Liu M, Cardella JA, Slutsky AS, Suga M, et al. Dynamic changes in apoptotic and necrotic cell death correlate with severity of ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. American Thoracic Society New York, NY; 2000 Nov;162(5):1932–9.
12. Fiser SM, Kron IL, Long SM, Kaza AK, Kern JA, Cassada DC, et al. Influence of graft ischemic time on outcomes following lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2001 Dec;20(12):1291–6.
13. Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA. Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol*. American Society for Investigative Pathology; 1997 May;150(5):1773–84.
14. Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *AJP: Lung Cellular and*

Molecular Physiology. 2014 Apr 15;306(8):L709–25.

15. Van der Kaaij NP, Bogers AJJC, Lachmann B. Ischemia-reperfusion Injury of the Lung: Role of Surfactant. In: Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine 2005. New York, NY: Springer New York; 2005. pp. 49–62.
16. Hameed A, Hruban RH, Gage W, Pettis G, Fox WM. Immunohistochemical expression of CD68 antigen in human peripheral blood T cells. Hum Pathol. 1994 Sep;25(9):872–6.
17. Nuovo GJ, Garofalo M, Valeri N, Roulstone V, Volinia S, Cohn DE, et al. Reovirus-associated reduction of microRNA-let-7d is related to the increased apoptotic death of cancer cells in clinical samples. Mod Pathol. Nature Publishing Group; 2012 Oct;25(10):1333–44.
18. Prakash A, Mesa KR, Wilhelmsen K, Xu F, Dodd-o JM, Hellman J. Alveolar Macrophages and Toll-like Receptor 4 Mediate Ventilated Lung Ischemia Reperfusion Injury in Mice. Anesthesiology. The American Society of Anesthesiologists; 2012 Oct;117(4):822–35.
19. Akbarshahi H, Menzel M, Posaric Bauden M, Rosendahl A, Andersson R. Enrichment of murine CD68+ CCR2+ and CD68+ CD206+ lung macrophages in acute pancreatitis-associated acute lung injury. Szecsi PB, editor. PLoS ONE. Public Library of Science; 2012;7(10):e42654.
20. Song J-X, Dian Z-J, Wen Y, Mei F, Li R-W, Sa Y-L. Assessment of the Number and Phenotype of Macrophages in the Human BMB Samples of CML. BioMed Research International. 2016;2016:1–9.
21. Thenappan T, Goel A, Marsboom G, Fang Y-H, Toth PT, Zhang HJ, et al. A central role for CD68(+) macrophages in hepatopulmonary syndrome. Reversal by macrophage depletion. Am J Respir Crit Care Med. American Thoracic Society; 2011 Apr 15;183(8):1080–91.
22. Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation; 1997 Jul 15;100(2):279–89.
23. Fialkow L, Fochesatto Filho L, Bozzetti MC, Milani AR, Rodrigues Filho EM, Ladniuk RM, et al. Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Crit Care. BioMed Central; 2006;10(6):R155.
24. Lee JS, Frevert CW, Matute-Bello G, Wurfel MM, Wong VA, Lin S-M, et al. TLR-4 pathway mediates the inflammatory response but not bacterial elimination in E. coli pneumonia. AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology. American Physiological Society; 2005 Nov;289(5):L731–8.
25. Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. Crit Care Med. 2003 Apr;31(Supplement):S184–8.

26. Pedreira PR, García-Prieto E, Albaiceta GM, Taboada F. [Inflammatory response and apoptosis in acute pulmonary injury]. *Medicina Intensiva*. 2006 Aug;30(6):268–75.
27. Sharma AK, Mulloy DP, Le LT, Laubach VE. NADPH oxidase mediates synergistic effects of IL-17 and TNF- α on CXCL1 expression by epithelial cells after lung ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. American Physiological Society; 2014 Jan 1;306(1):L69–79.
28. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Elsevier; 2003 Feb;125(2):261–72.
29. CHANG D-M, HSU K, DING Y-A, CHIANG C-H. Interleukin-1 in Ischemia-Reperfusion Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Oct;156(4):1230–4.
30. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA. Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol*. American Society for Investigative Pathology; 1985 Dec;121(3):394–403.
31. Huerta L, Rancan L, Simón C, Isea J, Vidaurre E, Vara E, et al. Ischaemic preconditioning prevents the liver inflammatory response to lung ischaemia/reperfusion in a swine lung autotransplant model. *Eur J Cardiothorac Surg*. Oxford University Press; 2013 Jun;43(6):1194–201.
32. Saini HK, Xu Y-J, Zhang M, Liu PP, Kirshenbaum LA, Dhalla NS. Role of tumour necrosis factor-alpha and other cytokines in ischemia-reperfusion-induced injury in the heart. *Exp Clin Cardiol*. Pulsus Group; 2005;10(4):213–22.
33. Teoh N, Field J, Sutton J, Farrell G. Dual role of tumor necrosis factor- α in hepatic ischemia-reperfusion injury: Studies in tumor necrosis factor- α gene knockout mice. *Hepatology*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2004;39(2):412–21.
34. Seta Y, Shan K, Bozkurt B, Oral H, Mann DL. Basic mechanisms in heart failure: The cytokine hypothesis. *Journal of Cardiac Failure*. Elsevier; 1996 Sep;2(3):243–9.
35. Keane MP, Strieter RM. Chemokine signaling in inflammation. *Crit Care Med*. 2000 Apr;28(4 Suppl):N13–26.
36. Schall TJ, Bacon KB. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Current Opinion in Immunology*. 1994 Dec;6(6):865–73.
37. Epstein FH, Luster AD. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 1998 Feb 12;338(7):436–45.
38. Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of

- monocyte recruitment in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today*. 1996 May;2(5):198–204.
39. Simón Adiego C, González-Casaurrán G, Azcárate Perea L, Isea Viña J, Vara Ameigeiras E, García Martín C, et al. Experimental Swine Lung Autotransplant Model to Study Lung Ischemia–Reperfusion Injury. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*. 2011 Jun;47(6):283–9.
 40. Lisignoli G, Toneguzzi S, Pozzi C, Piacentini A, Riccio M, Ferruzzi A, et al. Proinflammatory cytokines and chemokine production and expression by human osteoblasts isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1999 Apr;26(4):791–9.
 41. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 1991 Oct;88(4):1121–7.
 42. Fuse K, Kodama M, Hanawa H, Okura Y, Ito M, Shiono T, et al. Enhanced expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 in myocarditis. *Clin Exp Immunol*. Wiley-Blackwell; 2001 Jun;124(3):346–52.
 43. Hoffman SA, Wang L, Shah CV, Ahya VN, Pochettino A, Olthoff K, et al. Plasma cytokines and chemokines in primary graft dysfunction post-lung transplantation. *Am J Transplant*. Blackwell Publishing Inc; 2009 Feb;9(2):389–96.
 44. Altemeier WA, Liles WC, Villagra-Garcia A, Matute-Bello G, Glenny RW. Ischemia-reperfusion lung injury is attenuated in MyD88-deficient mice. Eltzschig HK, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2013;8(10):e77123.
 45. Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar macrophages initiate the systemic microvascular inflammatory response to alveolar hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011 Sep 30;178(3):439–48.
 46. D'Angio CT, Sinkin RA, LoMonaco MB, Finkelstein JN. Interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 mRNAs in oxygen-injured rabbit lung. *Am J Physiol*. 1995 May;268(5 Pt 1):L826–31.
 47. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, et al. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996 Sep;154(3 Pt 1):602–11.
 48. Lin W-C, Lin C-F, Chen C-L, Chen C-W, Lin Y-S. Prediction of outcome in patients with acute respiratory distress syndrome by bronchoalveolar lavage inflammatory mediators. *Experimental Biology and Medicine*. 2010 Jan;235(1):57–65.
 49. Stammberger U, Gaspert A, Hillinger S, Vogt P, Odermatt B, Weder W, et al. Apoptosis induced by ischemia and reperfusion in experimental lung transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000 May;69(5):1532–6.

50. Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. American Physiological Society; 2008 Apr;294(4):L632–41.
51. Ng CSH, Wan S, Yim APC. Pulmonary ischaemia-reperfusion injury: role of apoptosis. *Eur Respir J*. European Respiratory Society; 2005 Feb;25(2):356–63.
52. Lin X, Xu H, Zhao X, Liu X, Zhang K, Xu P. Antitumor effects of traditional Chinese medicine targeting the cellular apoptotic pathway. *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Press; 2015 May;Volume 9:2735–44.
53. Khan KH, Blanco-Codecido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Crit Rev Oncol Hematol*. Elsevier; 2014 Jun;90(3):200–19.
54. Cooke DT, Hoyt EG, Robbins RC. Overexpression of Human Bcl-2 in Syngeneic Rat Donor Lungs Preserves Posttransplant Function and Reduces Intra-graft Caspase Activity and Interleukin-1?? Production. *Transplantation*. 2005 Apr;79(7):762–7.
55. Liang Y, Yan C, Nylander KD, Schor NF. Early events in Bcl-2-enhanced apoptosis. *Apoptosis*. Kluwer Academic Publishers; 2003;8(6):609–16.
56. Wang J. DNA damage and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group; 2001 Nov;8(11):1047–8.
57. Cory AH, Edwards CC, Hall JG, Cory JG. Inhibitors of diverse metabolic steps cause increased apoptosis in deoxyadenosine-resistant mouse leukemia L1210 cells that lack p53 expression: convergence at caspase-3 activation. *Advances in Enzyme Regulation*. 2003 Jun;43(1):29–45.
58. Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2008 Dec;27 Suppl 1:S2–19.
59. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 6 ed. 2007 Jun;35(4):495–516.
60. Oliveira-Freitas VL, Thomaz LDGR, Simoneti LEL, Malfitano C, De Angelis K, Ulbrich JM, et al. RC-3095, a Selective Gastrin-Releasing Peptide Receptor Antagonist, Does Not Protect the Lungs in an Experimental Model of Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015(2):1–7.
61. Gottlieb RA, Finley KD, Mentzer RM. Cardioprotection requires taking out the trash. *Basic Res Cardiol*. D. Steinkopff-Verlag; 2009 Mar;104(2):169–80.
62. Borghi-Scoazec G. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transplantation*. 1997 Jul;3(4):407–15.
63. Shah KA, Shurey S, Green CJ. Apoptosis After Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation*. 1997 Nov;64(10):1393–7.
64. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ, Fuggle SV.

- Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation*. 1998 Oct 15;66(7):872–6.
65. Wolfs TGAM, de Vries B, Walter SJ, Peutz-Kootstra CJ, van Heurn LWE, Oosterhof GON, et al. Apoptotic cell death is initiated during normothermic ischemia in human kidneys. *Am J Transplant*. Munksgaard International Publishers; 2005 Jan;5(1):68–75.
 66. Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, et al. Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. *Annals of Surgery*. Lippincott, Williams, and Wilkins; 2000 Mar;231(3):424–31.
 67. Gown AM, Willingham MC. Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2002;50(4):449–54.
 68. Cobo JLE, Del Río Gallegos F. [Organ preservation]. *Medicina Intensiva*. 2009 Aug;33(6):282–92.
 69. Maathuis M-HJ, Leuvenink HGD, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. 2007 May 27;83(10):1289–98.
 70. Ben Abdennebi H, Zaouali MA, Alfany-Fernandez I, Tabka D, Roselló-Catafau J. How to protect liver graft with nitric oxide. *World Journal of Gastroenterology*. 2011 Jun 28;17(24):2879–89.
 71. Aoe M, Trachiotis GD, Okabayashi K, Manchester JK, Lowry OH, Cooper JD, et al. Administration of prostaglandin E1 after lung transplantation improves early graft function. *Ann Thorac Surg*. Elsevier; 1994 Sep;58(3):655–61.
 72. Gasparri RI, Jannis NC, Flameng WJ, Lerut TE, Van Raemdonck DE. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999 Dec;16(6):639–46.
 73. Turan NN, Yıldız G, Gumusel B, Demiryurek AT. ISCHEMIC AND PEROXYNITRITE PRECONDITIONING EFFECTS IN CHRONIC HYPOXIC RAT LUNG. *Experimental Lung Research*. Taylor & Francis; 2009 Jul 2;34(6):325–41.
 74. Javadpour, Kelly, Chen, Stokes, Leahy, Bouchier-Hayes. Thermotolerance induces heat shock protein 72 expression and protects against ischaemia-reperfusion-induced lung injury. *British Journal of Surgery*. Blackwell Science Ltd; 1998 Jul;85(7):943–6.
 75. Hirata T, Fukuse T, Ishikawa S, Hanaoka S, Chen Q, Shoji T, et al. “Chemical preconditioning” by 3-nitropropionate reduces ischemia-reperfusion injury in cardiac-arrested rat lungs. *Transplantation*. 2001 Feb 15;71(3):352–9.
 76. Casanova J, Garutti I, Simón C, Giraldez A, Martín B, Gonzalez G, et al. The effects of anesthetic preconditioning with sevoflurane in an experimental lung

- autotransplant model in pigs. *Anesth Analg*. 2011 Oct;113(4):742–8.
77. Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhan M, et al. A Randomized Controlled Trial on Pharmacological Preconditioning in Liver Surgery Using a Volatile Anesthetic. *Annals of Surgery*. 2008 Dec;248(6):909–18.
 78. Lei B, Popp S, Capuano-Waters C, Cottrell JE, Kass IS. Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*. 2004;125(3):691–701.
 79. Hollmann MW, Fischer LG, Byford AM, Durieux ME. Local anesthetic inhibition of m1 muscarinic acetylcholine signaling. *Anesthesiology*. 2000 Aug;93(2):497–509.
 80. Gallos G, Jones DR, Nasr SH, Emala CW, Lee HT. Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology*. 2004 Oct;101(4):902–11.
 81. Lahat A, Horin SB, Lang A, Fudim E, Picard O, Chowers Y. Lidocaine down-regulates nuclear factor- κ B signalling and inhibits cytokine production and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol*. Blackwell Publishing Ltd; 2008 Mar 19;152(2):320–7.
 82. McCarthy GC, Megalla SA, Habib AS. Impact of intravenous lidocaine infusion on postoperative analgesia and recovery from surgery: a systematic review of randomized controlled trials. *Drugs*. Springer International Publishing; 2010 Jun 18;70(9):1149–63.
 83. Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Suese Y, Yasuda H, Ohura K. Comparison of inhibitory effects of local anesthetics on immune functions of neutrophils. *Int J Immunopharmacol*. 2000 Oct;22(10):789–96.
 84. Huang TK, Uyehara CFT, Balaraman V, Miyasato CY, Person D, Egan E, et al. Surfactant lavage with lidocaine improves pulmonary function in piglets after HCl-induced acute lung injury. *Lung*. Springer-Verlag; 2004;182(1):15–25.
 85. Brigham KL. Role of free radicals in lung injury. *Chest*. 1986 Jun;89(6):859–63.
 86. Rodríguez NS, Barrasa JLM, González MÁP, García AL, Caballero JAR, García AT, et al. Assessment of Ischemia–Reperfusion Injury and Early Acute Rejection in Experimental Lung Transplantation After Prolonged Ischemia. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*. 2007 Jan;43(7):373–7.
 87. Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia–reperfusion and immune responses in the kidney. *Journal of Molecular Medicine*. Springer-Verlag; 2009 Jun 28;87(9):859–64.
 88. Menke J, Sollinger D, Schamberger B, Heemann U, Lutz J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2014 Aug;19(4):395–400.

89. Thabut G, Mal H, Cerrina J, Dartevielle P, Dromer C, Velly J-F, et al. Graft Ischemic Time and Outcome of Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. American Thoracic Society; 2005 Apr;171(7):786–91.
90. Hollmann MW, Durieux ME. Local Anesthetics and the Inflammatory Response. *Anesthesiology*. 2000 Sep;93(3):858–75.
91. Hollmann MW, Gross A, Jelacin N, Durieux ME. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology*. 2001 Jul;95(1):113–22.
92. Hollmann MW, Durieux ME, Graf BM. Novel local anaesthetics and novel indications for local anaesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2001 Dec;14(6):741–9.
93. Lee HT, Krichevsky IE, Xu H, Ota-Setlik A, D'Agati VD, Emala CW. Local anesthetics worsen renal function after ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. American Physiological Society; 2004 Jan;286(1):F111–9.
94. Giraud S, Favreau F, Chatauret N, Thuillier R, Maiga S, Hauet T. Contribution of large pig for renal ischemia-reperfusion and transplantation studies: the preclinical model. *J Biomed Biotechnol*. Hindawi Publishing Corporation; 2011;2011(21):532127–14.
95. Seeman P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol Rev*. 1972 Dec;24(4):583–655.
96. Hiller J, Ismail H, Riedel B. Improved Quality of Anesthesia and Cancer Recurrence Studies. *Anesth Analg*. 2014 Sep;119(3):751–2.
97. Cata JP, Bauer M, Sokari T, Ramirez MF, Mason D, Plautz G, et al. Effects of Surgery, General Anesthesia, and Perioperative Epidural Analgesia on the Immune Function of Patients With Non–Small Cell Lung Cancer. *Survey of Anesthesiology*. 2014 Aug;58(4):203–4.
98. Xuan W, Hankin J, Zhao H, Yao S, Ma D. The potential benefits of the use of regional anesthesia in cancer patients. *Int J Cancer*. 2015 Dec 15;137(12):2774–84.
99. Votta-Velis EG, Piegeler T, Minshall RD, Aguirre J, Beck-Schimmer B, Schwartz DE, et al. Regional anaesthesia and cancer metastases: the implication of local anaesthetics. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2013 Nov;57(10):1211–29.
100. Yukioka H, Tatekawa S, Nishimura K, Fujimori M. Influence of Alpha- and Beta-Adrenergic Blockade on Systemic and Pulmonary Hemodynamics During Intravenous Administration of Local Anesthetics. *Acta Anaesthesiol Scand*. Blackwell Publishing Ltd; 1984 Jun 1;28(3):339–47.
101. Toyoyama H, Yukioka H, Hayashi M, Tatekawa S, Fujimori M. Lidocaine-induced hemodynamic effects are enhanced by the inhibition of endothelium-derived relaxing factor in dogs. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997 Jun;41(6):766–

73.

102. Garutti I, Quintana B, Olmedilla L, Cruz A, Barranco M, de Lucas EG. Arterial Oxygenation During One-Lung Ventilation. *Anesth Analg.* 1999 Mar;88(3):494–9.
103. Dossow Von V, Welte M, Zaune U, Martin E, Walter M, Rückert J, et al. Thoracic epidural anesthesia combined with general anesthesia: the preferred anesthetic technique for thoracic surgery. *Anesth Analg.* 2001 Apr;92(4):848–54.
104. Casati A, Mascotto G, Iemi K, Nzepa-Batonga J, De Luca M. Epidural block does not worsen oxygenation during one-lung ventilation for lung resections under isoflurane/nitrous oxide anaesthesia. *European Journal of Anaesthesiology.* 2005 May;22(5):363–8.
105. Mikawa K, Maekawa N, Nishina K, Takao Y, Yaku H, Obara H. Effect of lidocaine pretreatment on endotoxin-induced lung injury in rabbits. *Anesthesiology.* 1994 Sep;81(3):689–99.
106. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Shiga M, Maekawa N, Obara H. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology.* 1998 May;88(5):1300–9.
107. Guinet P, Estebe J-P, Ratajczak-Enselme M, Bansard J-Y, Chevanne F, Bec D, et al. Electrocardiographic and Hemodynamic Effects of Intravenous Infusion of Bupivacaine, Ropivacaine, Levobupivacaine, and Lidocaine In Anesthetized Ewes. *Regional Anesthesia and Pain Medicine.* 2009 Jan;34(1):17–23.
108. Cohen E, Eisenkraft JB, Thys DM, Kirschner PA, Kaplan JA. Oxygenation and hemodynamic changes during one-lung ventilation: Effects of CPAP10, PEEP10, and CPAP10/PEEP10. *Journal of Cardiothoracic Anesthesia.* 1988 Feb;2(1):34–40.
109. Garutti I, Olmedilla L, Pérez-Peña JM, Arnal D, Piñeiro P, Barrigon S, et al. Hemodynamic effects of lidocaine in the thoracic paravertebral space during one-lung ventilation for thoracic surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* Elsevier; 2006 Oct;20(5):648–51.
110. Schmid RA, Yamashita M, Ando K, Tanaka Y, Cooper JD, Patterson GA. Lidocaine reduces reperfusion injury and neutrophil migration in canine lung allografts. *Ann Thorac Surg.* Elsevier; 1996 Mar;61(3):949–55.
111. Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med.* Copyright © 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA; 2006 Aug;27(4):337–49.
112. Stelzner TJ, Welsh CH, Berger E, McCullough RG, Morris K, Repine JE, et al. Antiarrhythmic agents diminish thiourea-induced pulmonary vascular protein leak in rats. *J Appl Physiol.* 1987 Nov;63(5):1877–83.

113. Takao Y, Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, Obara H. Lidocaine attenuates hyperoxic lung injury in rabbits. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1996 Mar;40(3):318–25.
114. Kiyonari Y, Nishina K, Mikawa K, Maekawa N, Obara H. Lidocaine attenuates acute lung injury induced by a combination of phospholipase A2 and trypsin. *Crit Care Med.* 2000 Feb;28(2):484–9.
115. Azoulay E, Herigault S, Levame M, Brochard L, Schlemmer B, Harf A, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on bleomycin-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis. *Crit Care Med.* 2003 May;31(5):1442–8.
116. Das KC, Misra HP. Prevention of reperfusion lung injury by lidocaine in isolated rat lung ventilated with higher oxygen levels. *J Postgrad Med.* 2003 Jan;49(1):17–20.
117. Lee E-H, Lee H-M, Chung C-H, Chin J-H, Choi D-K, Chung H-J, et al. Impact of intravenous lidocaine on myocardial injury after off-pump coronary artery surgery. *Br J Anaesth.* Oxford University Press; 2011 Apr;106(4):487–93.
118. Seal JB, Gewertz BL. Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg.* Elsevier; 2005 Jul;19(4):572–84.
119. Das KC, Misra HP. Amelioration of postischemic reperfusion injury by antiarrhythmic drugs in isolated perfused rat lung. *Environ Health Perspect.* National Institute of Environmental Health Science; 1994 Dec;102 Suppl 10(Suppl 10):117–21.
120. Yregård L, Cassuto J, Tarnow P, Nilsson U. Influence of local anaesthetics on inflammatory activity postburn. *Burns.* 2003 Jun;29(4):335–41.
121. Nishina K, Mikawa K, Maekawa N, Takao Y, Obara H. Does early posttreatment with lidocaine attenuate endotoxin-induced acute injury in rabbits? *Anesthesiology.* 1995 Jul;83(1):169–77.
122. Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J, Thomsen P. Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB4 release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1993 Feb;37(2):159–65.
123. Martinsson T, Haegerstrand A, Dalsgaard CJ. Effects of ropivacaine on eicosanoid release from human granulocytes and endothelial cells in vitro. *Inflammation Research.* Birkhäuser Verlag; 1997 Oct 1;46(10):398–403.
124. Snell GI, Rabinov M, Griffiths A, Williams T, Ugoni A, Salamonsson R, et al. Pulmonary allograft ischemic time: an important predictor of survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1996 Feb;15(2):160–8.
125. Bund M, Strüber M, Heine J, Jaeger K, Wahlers T, Haverich A, et al. Effect of lung allograft ischaemia duration on postreperfusion graft function and postoperative course. *Thorac Cardiovasc Surg.* © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York; 1998 Apr;46(2):93–6.

126. Glanville AR, Marshman D, Keogh A, Macdonald P, LARBalestier R, Kaan A, et al. Outcome in paired recipients of single lung transplants from the same donor. *J Heart Lung Transplant*. 1995 Sep;14(5):878–82.
127. Novick RJ, Bennett LE, Meyer DM, Hosenpud JD. Influence of graft ischemic time and donor age on survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1999 May;18(5):425–31.
128. Grimmond TR, Brownridge P. Antimicrobial activity of bupivacaine and pethidine. *Anaesth Intensive Care*. 1986 Nov;14(4):418–20.
129. Hyvönen PM, Kowolik MJ. Dose-dependent suppression of the neutrophil respiratory burst by lidocaine. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998 May;42(5):565–9.
130. Kawasaki T, Kawasaki C, Ogata M, Shigematsu A. The Effect of Local Anesthetics on Monocyte mCD14 and Human Leukocyte Antigen-DR Expression. *Anesth Analg*. 2004 Apr;:1024–9.
131. Takagi S, Kitagawa S, Oshimi K, Takaku F, Miura Y. Effect of local anaesthetics on human natural killer cell activity. *Clin Exp Immunol*. Wiley-Blackwell; 1983 Aug;53(2):477–81.
132. Schreiner A, Hoppen G. Adhesion and locomotion of human leukocytes in vitro; importance of protein coating; effect of lidocaine, ethanol and endotoxin. *Acta Pathol Microbiol Scand C*. 1979 Oct;87(5):333–40.
133. Thakur ML, Walsh LJ, Zaret BL, Gottschalk A. Effect of antiarrhythmic drugs on In-111-labeled leukocytes: chemotaxis and adherence to nylon wool. *J Nucl Med*. 1982 Feb;23(2):131–5.
134. Giddon DB, Lindhe J. In vivo quantitation of local anesthetic suppression of leukocyte adherence. *Am J Pathol*. American Society for Investigative Pathology; 1972 Aug;68(2):327–38.
135. Stewart GJ, Ritchie WG, Lynch PR. Venous endothelial damage produced by massive sticking and emigration of leukocytes. *Am J Pathol*. American Society for Investigative Pathology; 1974 Mar;74(3):507–32.
136. MacGregor RR, Thorner RE, Wright DM. Lidocaine inhibits granulocyte adherence and prevents granulocyte delivery to inflammatory sites. *Blood*. 1980 Aug;56(2):203–9.
137. Eriksson AS, Sinclair R, Cassuto J, Thomsen P. Influence of lidocaine on leukocyte function in the surgical wound. *Anesthesiology*. 1992 Jul;77(1):74–8.
138. Sasagawa S. Inhibitory effects of local anesthetics on migration, extracellular release of lysosomal enzyme, and superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1991;13(4):607–22.
139. Rabinovitch M, DeStefano MJ. Use of the local anesthetic lidocaine for cell

- harvesting and subcultivation. *In Vitro*. Springer-Verlag; 1975 Nov;11(6):379–81.
140. Jones G, Hurley JV. The effect of prostacyclin on the adhesion of leucocytes to injured vascular endothelium. *J Pathol*. John Wiley & Sons, Ltd; 1984 Jan;142(1):51–9.
 141. Lan W, Harmon DC, Wang JH, Shorten GD, Redmond PH. Activated endothelial interleukin-1beta, -6, and -8 concentrations and intercellular adhesion molecule-1 expression are attenuated by lidocaine. *Anesth Analg*. 2005 Feb;100(2):409–12.
 142. Herold S, Mayer K, Lohmeyer J. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. *Front Immunol*. Frontiers; 2011;2:65.
 143. Herold S, Wulffen von W, Steinmueller M, Pleschka S, Kuziel WA, Mack M, et al. Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules. *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists; 2006 Aug 1;177(3):1817–24.
 144. Cabanski M, Steinmüller M, Marsh LM, Surdziel E, Seeger W, Lohmeyer J. PKR regulates TLR2/TLR4-dependent signaling in murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Jan;38(1):26–31.
 145. Cakarova L, Marsh LM, Wilhelm J, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, et al. Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair. *Am J Respir Crit Care Med*. American Thoracic Society; 2009 Sep 15;180(6):521–32.
 146. Van Den Berg JM, Weyer S, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Divergent effects of tumour necrosis factor-alpha on apoptosis of human neutrophils. *Transfusion Medicine*. Blackwell Science Ltd; 2001 Dec 25;10(4):330–1.
 147. Taneja R, Parodo J, Jia SH, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity*. *Crit Care Med*. 2004 Jul;32(7):1460–9.
 148. Cullen BF, Haschke RH. Local anesthetic inhibition of phagocytosis and metabolism of human leukocytes. *Anesthesiology*. 1974 Feb;40(2):142–6.
 149. Welters ID, Menzebach A, Langefeld TW, Menzebach M, Hempelmann G. Inhibitory effects of S-(-) and R-(+) bupivacaine on neutrophil function. *Acta Anaesthesiol Scand*. Munksgaard International Publishers; 2001 May;45(5):570–5.
 150. Peck SL, Johnston RB, Horwitz LD. Reduced neutrophil superoxide anion release after prolonged infusions of lidocaine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985 Nov;235(2):418–22.

151. CELEBI H. Effect of high-dose lidocaine treatment on superoxide dismutase and malon dialdehyde levels in seven diabetic patients. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 2000 Jun;25(3):279–82.
152. CEDERHOLM I, BRIHEIM G, RUTBERG H, DAHLGREN C. Effects of five amino-amide local anaesthetic agents on human polymorphonuclear leukocytes measured by chemiluminescence. *Acta Anaesthesiol Scand*. Blackwell Publishing Ltd; 1994 Oct;38(7):704–10.
153. Ebel D, Lipfert P, Fra dorf J, Preckel B, Mullenheim J, Thamer V, et al. Lidocaine reduces ischaemic but not reperfusion injury in isolated rat heart. *Br J Anaesth*. Oxford University Press; 2001 Jun 1;86(6):846–52.
154. Kowaltowski AJ, Costa ADT, Vercesi AE. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Letters*. 1998 Apr 7;425(2):213–6.
155. Raucher D, Sheetz MP. Phospholipase C activation by anesthetics decreases membrane-cytoskeleton adhesion. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 20):3759–66.
156. Cassuto J, Nellgård P, Stage L, Jönsson A. Amide local anesthetics reduce albumin extravasation in burn injuries. *Anesthesiology*. 1990 Feb;72(2):302–7.
157. Li C-Y, Tsai C-S, Hsu P-C, Chueh S-H, Wong C-S, Ho S-T. Lidocaine Attenuates Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production and Chemotaxis in Human Monocytes: Possible Mechanisms for Its Effect on Inflammation. *Anesth Analg*. 2003 Nov;;:1312–6.
158. Shah RJ, Diamond JM, Lederer DJ, Arcasoy SM, Cantu EM, Demissie EJ, et al. Plasma monocyte chemotactic protein-1 levels at 24 hours are a biomarker of primary graft dysfunction after lung transplantation. *Transl Res*. 2012 Dec;160(6):435–42.
159. Rollins BJ. JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer Cells*. 1991 Dec;3(12):517–24.
160. Ohishi K, Suzuki T, Uchida MK. Different effects of local anesthetics on calcium influx into rat mast cells. *Gen Pharmacol*. 1985;16(3):199–203.
161. Tousson E, Hafez E, Zaki S, Gad A. P53, Bcl-2 and CD68 expression in response to amethopterin-induced lung injury and ameliorating role of L-carnitine. *Biomed Pharmacother*. 2014 Jun;68(5):631–9.
162. Venosa A, Malaviya R, Choi H, Gow AJ, Laskin JD, Laskin DL. Characterization of Distinct Macrophage Subpopulations during Nitrogen Mustard-Induced Lung Injury and Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016 Mar;54(3):436–46.
163. Naidu BV, Woolley SM, Farivar AS, Thomas R, Fraga CH, Goss CH, et al. Early tumor necrosis factor-alpha release from the pulmonary macrophage in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Elsevier; 2004 May;127(5):1502–8.

164. Zhang Y-X, Fan H, Shi Y, Xu S-T, Yuan Y-F, Zheng R-H, et al. Prevention of lung ischemia-reperfusion injury by short hairpin RNA-mediated caspase-3 gene silencing. *J Thorac Cardiovasc Surg. Elsevier*; 2010 Mar;139(3):758–64.
165. Yousefi H, Ahmadiasl N, Alihemmati A, Habibi P. Effect of renal ischemia-reperfusion on lung injury and inflammatory responses in male rat. *Iran J Basic Med Sci. Mashhad University of Medical Sciences*; 2014 Oct;17(10):802–7.
166. Shi L, Jia X-G, Luo M, Liu Y-K, Zhao S, Chen H-E, et al. [Effects of ischemic postconditioning on pneumocyte apoptosis after lung ischemia/reperfusion injury in rats]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2014 Jan;30(1):60–3.
167. Yang Y, Chen S-X, Zhang W-X. [Effect of ischemic preconditioning on human lung cell apoptosis in vivo and the expression of regulating gene bcl-2]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2002 Feb 28;27(1):43–5.
168. Hassoun HT, Lie ML, Grigoryev DN, Liu M, Tuder RM, Rabb H. Kidney ischemia-reperfusion injury induces caspase-dependent pulmonary apoptosis. *AJP: Renal Physiology*. 2009;297(1):F125–37.
169. de Graaf W, Diepenhorst GMP, Herroeder S, Erdogan D, Hollmann MW, van Gulik TM. Systemic lidocaine does not attenuate hepatic dysfunction after liver surgery in rats. *Anesth Analg*. 2012 Mar;114(3):566–73.
170. Durieux ME, Tiouririne M. Anesthesia and cancer recurrence: is the balance of evidence shifting? *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 2014 May;39(3):177–8.
171. Durieux ME. Anesthesia and cancer recurrence: improved understanding, but no reason for change. *Anesth Analg*. 2014 Jan;118(1):8–9.
172. Ohno S, Kobayashi K, Uchida S, Amano O, Sakagami H, Nagasaka H. Cytotoxicity and type of cell death induced by midazolam in human oral normal and tumor cells. *Anticancer Res*. 2012 Nov;32(11):4737–47.
173. Cassinello F, Prieto I, del Olmo M, Rivas S, Strichartz GR. Cancer surgery: how may anesthesia influence outcome? *J Clin Anesth. Elsevier*; 2015 May;27(3):262–72.
174. Lucchinetti E, Awad AE, Rahman M, Feng J, Lou P-H, Zhang L, et al. Antiproliferative effects of local anesthetics on mesenchymal stem cells: potential implications for tumor spreading and wound healing. *Anesthesiology. The American Society of Anesthesiologists*; 2012 Apr;116(4):841–56.
175. Fraser SP, Foo I, Djamgoz MBA. Local anaesthetic use in cancer surgery and disease recurrence: role of voltage-gated sodium channels? *Br J Anaesth. Oxford University Press*; 2014 Dec;113(6):899–902.
176. Baptista-Hon DT, Robertson FM, Robertson GB, Owen SJ, Rogers GW, Lydon EL, et al. Potent inhibition by ropivacaine of metastatic colon cancer SW620 cell invasion and NaV1.5 channel function. *Br J Anaesth. Oxford University*

Press; 2014 Jul;113 Suppl 1(suppl 1):i39–i48.

177. Jablons. Procaine and procainamide inhibit the Wnt canonical pathway by promoter demethylation of WIF-1 in lung cancer cells. *Oncology Reports*. Spandidos Publications; 2009 Oct 14;22(06):1479–84.
178. Chang Y-C, Liu C-L, Chen M-J, Hsu Y-W, Chen S-N, Lin C-H, et al. Local anesthetics induce apoptosis in human breast tumor cells. *Anesth Analg*. 2014 Jan;118(1):116–24.
179. Piegeler T, Votta-Velis EG, Liu G, Place AT, Schwartz DE, Beck-Schimmer B, et al. Antimetastatic potential of amide-linked local anesthetics: inhibition of lung adenocarcinoma cell migration and inflammatory Src signaling independent of sodium channel blockade. *Anesthesiology*. The American Society of Anesthesiologists; 2012 Sep;117(3):548–59.
180. Kaczmarek DJ, Herzog C, Larmann J, Gillmann H-J, Hildebrand R, Schmitz M, et al. Lidocaine Protects from Myocardial Damage due to Ischemia and Reperfusion in Mice by Its Antiapoptotic Effects. *Anesthesiology*. The American Society of Anesthesiologists; 2009 May;110(5):1041–9.
181. Guschlbauer M, Slapa J, Huber K, Feige K. Lidocain reduziert die Bildung eines Gewebeödemes in der ischämisch- reperfusionsgeschädigten Darmwand des Pferdes. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*. 2010;26(4):531–4.
182. Werdehausen R, Braun S, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Walczak H, Lipfert P, et al. Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology*. 2007 Jul;107(1):136–43.
183. Lin J-P. Norcantharidin triggers cell death and DNA damage through S-phase arrest and ROS-modulated apoptotic pathways in TSGH128301 human urinary bladder carcinoma cells. *International Journal of Oncology*. Spandidos Publications; 2012 Jun 7;41(3):1050–60.
184. Chang Y-C, Hsu Y-C, Liu C-L, Huang S-Y, Hu M-C, Cheng S-P. Local Anesthetics Induce Apoptosis in Human Thyroid Cancer Cells through the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. Jiang Y, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2014 Feb 21;9(2):e89563.
185. Lirk P, Haller I, Colvin HP, Lang L, Tomaselli B, Klimaschewski L, et al. In vitro, inhibition of mitogen-activated protein kinase pathways protects against bupivacaine- and ropivacaine-induced neurotoxicity. *Anesth Analg*. 2008 May;106(5):1456–64–tableofcontents.
186. Wang H-W, Wang L-Y, Jiang L, Tian S-M, Zhong T-D, Fang X-M. Amide-linked local anesthetics induce apoptosis in human non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*. 2016 Oct;8(10):2748–57.
187. Sakaguchi M, Kuroda Y, Hirose M. The antiproliferative effect of lidocaine on human tongue cancer cells with inhibition of the activity of epidermal growth factor receptor. *Anesth Analg*. 2006 Apr;102(4):1103–7.

188. Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, Hermanns H, Essmann F, Hollmann MW, et al. Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line. *Br J Anaesth*. Oxford University Press; 2009 Nov;103(5):711–8.
189. Lee HT, Xu H, Siegel CD, Krichevsky IE. Local anesthetics induce human renal cell apoptosis. *American Journal of Nephrology*. Karger Publishers; 2003 May;23(3):129–39.
190. Grishko V, Xu M, Wilson G, Pearsall AW. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Mar;92(3):609–18.